



Universidade Nova de Lisboa

Instituto de Higiene e Medicina Tropical

Schistosoma mansoni e resistência ao Praziquantel
em modelo animal

Mariana Albuquerque da Silva

**DISSERTAÇÃO PARA A OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE EM
PARASITOLOGIA MÉDICA**

(OUTUBRO, 2014)



Universidade Nova de Lisboa

Instituto de Higiene e Medicina Tropical

Schistosoma mansoni e resistência ao Praziquantel
em modelo animal

Autor: Mariana Albuquerque da Silva

Orientador: Doutor Pedro Manuel M. C. Ferreira

Coorientador: Professor Doutor Henrique Silveira

Agradecimentos

O trabalho realizado foi desenvolvido na Universidade Nova de Lisboa (UNL), no Instituto de Higiene e Medicina Tropical (IHMT) na Unidade de Ensino e Investigação em Parasitologia Médica (UEIPM), no Grupo de Helminologia e Malacologia Médicas.

Gostaria de agradecer a todas as pessoas que contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho.

Ao **Doutor Pedro Ferreira** pela orientação, pelo apoio, pela paciência e pela disponibilidade que foi fundamental durante todo o trabalho.

Ao **Professor Doutor Henrique Silveira**, Subdiretor do IHMT da UNL e Coordenador do Centro de Malária e outras Doenças Tropicais, pela ajuda na orientação e direção do plano da tese.

À **Professora Doutora Silvana Belo**, Diretora da UEIPM e do grupo de Helminologia e Malacologia Médica, pela ajuda ao longo do trabalho em especial na análise estatística dos resultados e na realização das ELISAs.

À **Mestre Teresa Lacerda** por toda ajuda no processamento e análise histológica.

À **Doutora Ana Afonso** por toda a ajuda disponibilizada ao longo do trabalho, desde a sua planificação até à revisão da tese.

Ao **Dr. Tiago Mendes** e ao **Mestre António Pinto** pela grande ajuda em tudo o que esteve relacionado com a infeção dos murganhos.

À **Professora Doutora Manuela Calado** pela ajuda na infeção dos murganhos e disponibilidade ao longo de todo o trabalho.

Aos **Técnicos do Laboratório de Urgência do hospital de Egas Moniz** pela ajuda na realização dos hemogramas.

À **Técnica Especialista Maria Isabel Clemente** pela ajuda no processo de sonicação dos ovos do parasita.

À **Professora Doutora Isabel Maurício** pela correção do abstract.

À **Doutora Dinora**, ao **Sr. Vítor** e à **D. Rosário** pela ajuda e pela paciência na recolha de amostras e no controlo dos murganhos ao longo do trabalho.

Aos meus **Colegas** do Curso de Mestrado pela amizade e pelo companheirismo neste dois anos de curso entre todos.

Aos meus **Pais** pelas oportunidades que me deram e pelos ensinamentos que me trouxeram até aqui.

Resumo

A shistosomose é uma doença tropical de grande impacto socioeconómico e um grave problema de saúde pública em diversas partes do globo. Endémica em 78 países, afeta mais de 200 milhões de pessoas.

A infeção do hospedeiro definitivo faz-se pelo contato direto com águas contaminadas por cercárias do parasita do género *Schistosoma*. Nas primeiras semanas após a infeção o parasita percorre o organismo do hospedeiro definitivo, desencadeando uma resposta imunológica do tipo Th1. Com o início da oviposição, principal razão da patologia desta parasitose, começa a desenvolver-se uma resposta mais acentuada do tipo Th2.

O Praziquantel tem sido o fármaco de eleição para o tratamento e o controlo da schistosomose. Porém têm aparecido indícios de uma diminuição da suscetibilidade do parasita a este fármaco em algumas partes do mundo como no Egito, Quênia e Senegal. Como consequência, têm surgido vários trabalhos que abordam este tema e inclusive já foi comprovada a possibilidade destes parasitas desenvolverem resistência ao Praziquantel, em laboratório.

O presente trabalho teve como objetivo comparar parâmetros morfológicos, hematológicos, imunológicos e histológicos entre a infeção por uma estirpe de *Schistosoma mansoni* sensível ao tratamento com Praziquantel e outra resistente a este fármaco até 120 mg/Kg, em três tempos de infeção (6, 8 e 10 semanas). Avaliou-se então o peso do fígado e do baço, a carga parasitária, os valores de hemoglobina, hematócrito, o número de eritrócitos e os níveis séricos das imunoglobulinas IgG₁ e IgG_{2a}. Também foram estudados três parâmetros histológicos como: a medição, quantificação e classificação dos granulomas hepáticos.

Foram encontradas diferenças estatisticamente significativas no peso do fígado, tamanho e fase de desenvolvimento dos granulomas hepáticos. O fígado apresentou um peso superior nos murganhos infetados com a estirpe de *S. mansoni* sensível ao Praziquantel às 6 e 10 semanas de infeção. Também na infeção por esta estirpe o tamanho dos granulomas hepático foi superior às 10 semanas. A percentagem de granulomas hepáticos nas fases dominantes de desenvolvimento nas 6^a e 8^a semanas foi superior nos murganhos infetados com a estirpe de *S. mansoni* sensível ao Praziquantel.

Dos resultados obtidos podemos inferir que a infeção pela estirpe resistente ao Praziquantel foi menos severa do que a infeção pela estirpe sensível, o que pode indicar uma debilidade e redução do *fitness* desta estirpe, resultante da ação do Praziquantel.

Palavras-chave: *Schistosoma mansoni*; Praziquantel; Resistência; Suscetibilidade

Abstract

Schistosomiasis is a tropical disease with great socio-economic impact and a serious public health problem in several parts of the world. It is endemic in 78 developing countries and it affects more than 200 million people.

Definitive hosts become infected after contact with water contaminated with the larval stage of parasites of the genus *Schistosoma*. After skin penetration by the cercariae, the resultant schistosomulae will enter the blood stream and mature until the adults mate and settle in the mesenteric venules of the bowel, in the case of *Schistosoma mansoni*. The initial phase is characterized by a Th1 immune response. Oviposition is the main cause of pathology, inducing a Th2 immune response.

Praziquantel has been the preferential drug against this parasite. Nevertheless, some evidence of drug resistance has been reported and investigated in several parts of the world, such as Egypt, Kenya and Senegal. Resistance to Praziquantel has since been achieved in the laboratory.

This work aimed to compare morphological, immunological and histological parameters, between schistosome infections in mice by two strains: a wild strain of *S. mansoni* sensitive to Praziquantel, and a strain resistant to 120 mg/Kg of Praziquantel, at three times post- infection (6, 8 and 10 weeks).

Liver, spleen and total body weight were evaluated, as well as parasite load, haemoglobin, haematocrit, number of red blood cells and serum levels of IgG₁ and IgG_{2a}. It was also determined the number, stage and size of liver granuloma.

Significant statistical differences were found in liver weight, size and granuloma developing phase. Mice infected with *S. mansoni* sensitive to Praziquantel strain at 6th and 10th weeks after infection had higher liver weight. These mice also had larger hepatic granulomas at the 10th week. The mice infected with the Praziquantel sensitive *S. mansoni* strain presented higher percentages of granuloma development at 6th and 8th weeks after infection.

It can be concluded that infection by the resistant strain of *S. mansoni* produced a less severe infection in mice, which may be related to debility and fitness reduction caused by the Praziquantel resistance phenotype.

Keywords: *Schistosoma mansoni*; Praziquantel; Resistance; Susceptibility

Índice

	Página
Agradecimentos	v
Resumo	vii
Abstract	viii
Índice	ix
Índice de Figuras	xii
Índice de Tabelas	xv
Abreviaturas e Siglas	xvii
Capítulo I Introdução	1
1. A Schistosomose	3
1.1. Distribuição geográfica e epidemiológica	4
1.2. Os Parasitas	7
1.2.1 Classificação taxonómica	7
1.2.2 Ciclo de vida e Características morfológicas	8
1.3. Hospedeiro intermediário	11
1.4. Patologia e Resposta imunológica	12
1.5 Tratamento e Controlo	16
1.6. Diagnóstico	19
Capítulo II Objetivos	21
1. Objetivos gerais	23
2. Objetivos específicos	23
Capítulo III Materiais e Métodos	25
1. Plano de estudo	27
2. Modelos animais	28

3. Infecções experimentais	28
3.1 Infecção dos murganhos	28
4. Controlo do peso.....	29
5. Controlo da carga parasitária	30
6. Colheita de amostras	31
6.1 Colheita de sangue	31
6.2. Remoção do fígado, baço e intestino	31
7. Preparação do Antígeno Solúvel do Ovo de <i>S. mansoni</i> (ASO).....	31
8. Doseamento de imunoglobulinas anti- <i>S. mansoni</i>	33
9. Análise histológica	34
9.1 Quantificação, Medição e Classificação de granulomas	35
10. Determinações analíticas	36
10.1. Indicadores hematológicos	36
10.2 Tratamento estatístico dos resultados	36
 Capítulo IV Resultados	 39
1. Peso total	41
2. Peso do fígado	42
3. Peso do baço	42
4. Carga parasitária de <i>S. mansoni</i>	43
5. Indicadores hematológicos	44
5.1.Número de eritrócitos	44
5.2.Valores de hemoglobina	45
5.3.Valores de hematócrito	46
6. Perfil das imunoglobulinas IgG ₁ e IgG _{2a}	47
7. Análise histológica dos granulomas hepáticos	49
7.1.Quantificação dos granulomas	52
7.2.Medição dos granulomas	53
7.3. Classificação dos granulomas	54

Capítulo V	Discussão e Conclusões	59
1	Discussão	61
2	Conclusões	73
Referências Bibliográficas		75
Anexos		89
	Conversão do número de ovos a partir da técnica de Kato-Katz.....	91

Índice de Figuras

	Página
Figura 1 Distribuição mundial de <i>S. haematobium</i> , <i>S. japonicum</i> e <i>S. mekongi</i>	4
Figura 2 Distribuição mundial de <i>S. mansoni</i> e <i>S. intercalatum</i>	5
Figura 3 Ovo de <i>S. mansoni</i> b - Ovo de <i>S. intercalatum</i> ; c - Ovo de <i>S. haematobium</i> ; d - Ovo de <i>S. japonicum</i>	7
Figura 4 Ciclo de vida de <i>Schistosoma</i> spp	8
Figura 5 Macho e fêmea de <i>Schistosoma</i>	9
Figura 6 <i>Biomphalaria glabrata</i>	11
Figura 7 <i>Bulinus truncatus</i>	11
Figura 8 <i>Oncomelania</i> sp	11
Figura 9 <i>Tricula aperta</i>	11
Figura 10 Poster de uma campanha de conscientização sobre schistosomose no Brasil	16
Figura 11 <i>Mus musculus</i> fêmea	28
Figura 12 Exposição de moluscos à luz	28
Figura 13 Cercária de <i>S. mansoni</i>	29
Figura 14 Infecção de murganhos com <i>S. mansoni</i>	29
Figura 15 Pesagem dos murganhos	29
Figura 16 Colheita de sangue por punção cardíaca	31
Figura 17 Colheita de órgãos	31
Figura 18 Sonicador <i>MSE Ultrasonic Power Unit</i>	32
Figura 19 Processador automático de tecidos <i>Termoshandon</i>	34
Figura 20 Sequência para a obtenção de amostras histológicas. (a) Amostras em cassetes de histologia. (b) Molde com amostras impregnadas com parafina. (c) Amostras envolvidas no bloco de parafina	35
Figura 21 Máquina de coloração automática <i>Autostain XI-Laica</i>	35
Figura 22 Analisador hematológico <i>Coulter LH 750</i>	36
Figura 23 Variação do peso total dos ratinhos ao longo da infecção	41
Figura 24 Variação do peso do fígado ao longo da infecção	42
Figura 25 Variação do peso do baço ao longo da infecção	43
Figura 26 Variação da carga parasitária ao longo da infecção	44

Figura 27	Número de eritrócitos ao longo da infecção	45
Figura 28	Variação dos valores de hemoglobina ao longo da infecção	46
Figura 29	Variação dos valores de hematócrito ao longo da infecção	47
Figura 30	Níveis séricos de IgG ₁ doseados por ELISA ao longo da infecção	48
Figura 31	Níveis séricos de IgG _{2a} detetados por ELISA ao longo da infecção	49
Figura 32	Granuloma no fígado na fase de reação-inicial. (a) Coloração de H&E	50
Figura 33	Granuloma no fígado na fase exsudativa. (a) Coloração de H&E. (b) coloração de Tricrómio de Masson	50
Figura 34	Granuloma no fígado na fase exsudativa-produtiva. (a) Coloração de H&E. (b) Coloração de Tricrómio de Masson	51
Figura 35	Granuloma no fígado na fase produtiva. (a) Coloração de H&E. (b) Coloração de Tricrómio de Masson	51
Figura 36	Granulomas intestinais. (a) Coloração de H&E. (b) Coloração de Tricrómio de Masson	52
Figura 37	Número de granulomas no fígado ao longo da infecção	53
Figura 38	Diâmetro médio dos granulomas ao longo da infecção	54
Figura 39	Percentagem de granulomas nas cinco fases de desenvolvimento às seis semanas de infecção, no fígado. RI- Reação inicial; E- Exsudativa; EP- Exsudativa-Produtiva; P- Produtiva; I- Involutiva	55
Figura 40	Percentagem de granulomas nas cinco fases de desenvolvimento às oito semanas de infecção, no fígado. RI- Reação inicial; E- Exsudativa; EP- Exsudativa-Produtiva; P- Produtiva; I- Involutiva	56
Figura 41	Percentagem de granulomas nas cinco fases de desenvolvimento às dez semanas de infecção, no fígado. RI- Reação inicial; E- Exsudativa; EP- Exsudativa-Produtiva; P- Produtiva; I- Involutiva	57

Índice de Tabelas

	Página
Tabela 1 Descrição das 5 fases do granuloma	14
Tabela 2 Semanas em que os murganhos foram eutanasiados, após infecção por SmBH e SmBHR e número de murganhos utilizados para cada estirpe de <i>S. mansoni</i>	27

Abreviaturas e Siglas

Ag – Antigénio

ASO - Antigénio solúvel do ovo

CDC - *Centers for Disease Control*

DALY's – *Disability-Adjusted Life Years*

DO – Densidade ótica

E – Fase Exsudativa do granuloma

EDTA - Ácido etilenodiamino tetra-acético

ELISA – *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*

EP – Fase Exsudativa-Produtiva do granuloma

G – Força g Centrifuga

H&E – Coloração Hematoxilina-Eosina

HBSS – *Hanks Balanced Salt Solution*

IFN- γ – Interferão gama

Ig - Imunoglobulina

IL – Interleucina

I – Fase Involutiva do granuloma

MW – Mann -Whitney

OMS/WHO – Organização Mundial de Saúde

P – Fase produtiva do granuloma

PBST- Tampão Fosfato Salino com solução detergente Tween20

PZQ – Praziquantel

RI – Fase de Reação Inicial do granuloma

SmBH – Estirpe de *S. mansoni* de Belo Horizonte

SPSS - Statistical Package for the Social Sciences

TNF- Fator de Necrose Tumoral

UEIPM (GHMM)/IHMT - Unidade de Ensino e Investigação em Parasitologia Médica
/ Grupo de Helminologia e Malacologia Médicas/ Instituto de Higiene e Medicina
Tropical

VIH/SIDA - Vírus de Imunodeficiência Humana/ Síndrome da imunodeficiência
adquirida

Capítulo I – Introdução

1 Schistosomose

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS) um sexto da população mundial padece pelo menos de uma doença negligenciada (WHO, 2012). Estas doenças afetam sobretudo populações de nível socioeconómico mais baixo sendo um fator que contribui para que assim permaneçam.

A schistosomose é uma doença negligenciada, provocada por parasitas do género *Schistosoma*, afetando mais de 200 milhões de pessoas e é considerado endémico em 78 países (WHO, 2014a; Gryseels *et al.*, 2006). Esta doença tropical, de grande impacto socioeconómico é um grave problema de saúde pública em diversas partes do globo, particularmente no continente africano, onde segundo o “*Global Health Observatory*” se encontra cerca de 90% da população a necessitar de tratamento preventivo (WHO, 2014b; Jeziorski & Greenberg, 2006). O peso desta doença em termos de saúde mundial já é considerado por alguns autores como sendo aproximado ao da malária ou ao da tuberculose (Steinmann *et al.*, 2006; Hotez & Fenwick, 2009; King & Dangerfield-Cha, 2008). Estima-se que os “*Disability-Adjusted Life Years*” (DALY’s) perdidos por schistosomose sejam quase equivalentes aos perdidos por VIH/SIDA (Hotez & Fenwick, 2009).

Esta parasitose tem como principais agentes etiológicos, para o Homem, as espécies: *Schistosoma mansoni*, *Schistosoma japonicum* e *Schistosoma haematobium*. Apresentando uma distribuição mais restrita, *Schistosoma intercalatum* e *Schistosoma mekongi* também possuem a capacidade de infetar humanos.

Dependendo da espécie em causa, os parasitas do género *Schistosoma* podem provocar schistosomose intestinal (*S. mansoni*, *S. japonicum*, *S. intercalatum* e *S. mekongi*) ou schistosomose urogenital (*S. haematobium*).

A transmissão deste parasita requer três fatores principais: uma fonte de água contaminada, o contacto humano com este recurso de água e hospedeiros intermediários (molusco de água doce).

A patologia no hospedeiro definitivo tem como característica possuir 2 fases distintas. Uma primeira fase aguda e posteriormente uma fase crónica. Ambas estão intimamente relacionadas com a etapa do ciclo de vida em que o parasita se encontra no organismo do hospedeiro.

1.1 Distribuição geográfica e epidemiologia

Estima-se que mais de 200 milhões de pessoas sejam afetados por esta parasitose e que este seja responsável por cerca de 200 mil mortes por ano (Pérez Del Villar *et al.*, 2013). A transmissão dos parasitas do género *Schistosoma* ao Homem, dá-se por contato direto com águas contaminadas com as formas infetantes do parasita.

Assim, é espectável que a distribuição geográfica deste tremátode esteja intimamente relacionada com a presença do hospedeiro intermediário e às fases de vida livre do parasita (ovo, miracídio e cercária). Outro fator preponderante é a falta de condições de saneamento, resultante, em parte, do baixo nível socioeconómico da população, que tem de recorrer aos cursos de água locais para grande parte das tarefas e necessidades do dia-a-dia (Vitorino *et al.*, 2012; Rey, 2010).

O parasita *S. haematobium* encontra-se amplamente distribuído em África e no médio oriente, enquanto *S. japonicum* abrange a China e o sudeste asiático enquanto *S. mekongi* encontra-se restrito ao vale do rio Mekong, no Camboja (Fig.1). Na Fig 2 pode-se observar a ampla distribuição de *S. mansoni* no continente africano, Ásia, Sul da América, Médio oriente e Caraíbas e a distribuição apenas na África central de *S. intercalatum*.

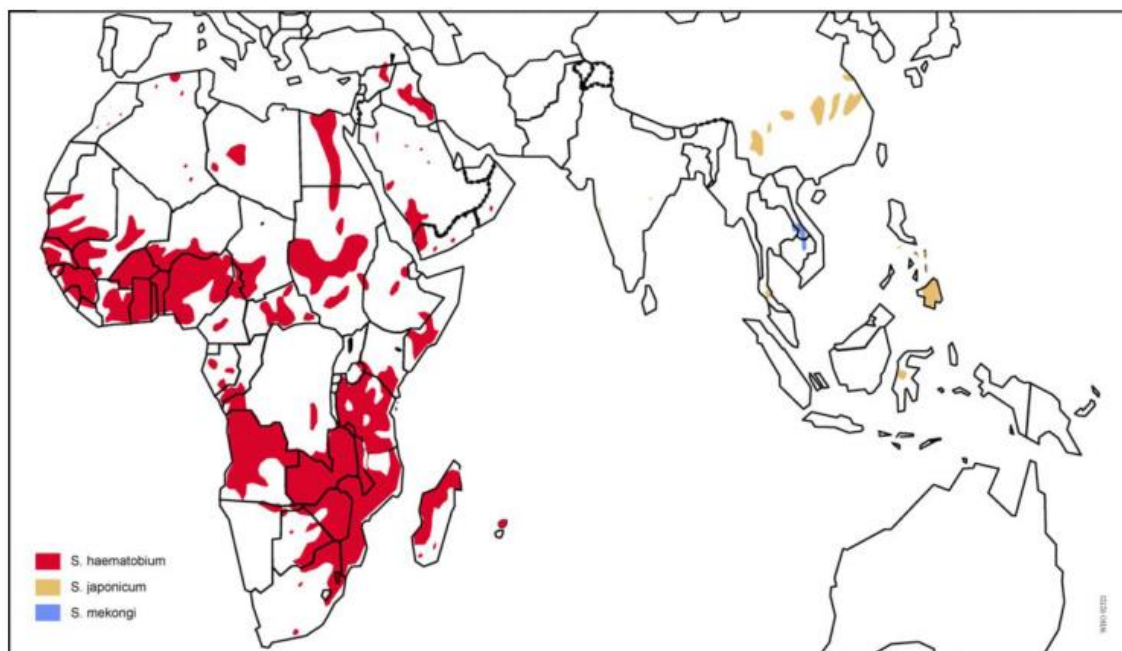


Figura 1 - Distribuição mundial de *S. haematobium*, *S. japonicum* e *S. mekongi* (Blanchard, 2004).

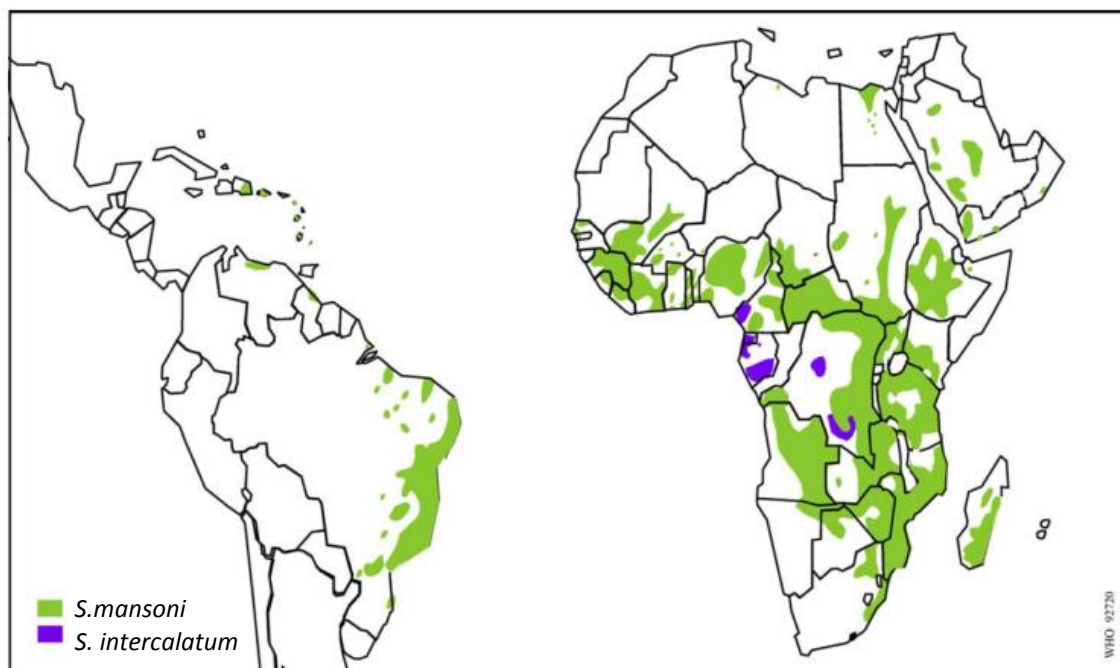


Figura 2 - Distribuição mundial de *S. mansoni* e *S. intercalatum* (Blanchard, 2004).

Existem evidências de alterações da prevalência desta infecção que poderão estar relacionadas com o crescimento das áreas urbanas e zonas irrigadas (Steinmann *et al.*, 2006), assim como, com a maior mobilidade de pessoas para locais endêmicos (Conlon, 2005). Entre 1997 e 2008, segundo o estudo realizado pela rede de vigilância “Geosentinel (*The Global Surveillance Network of the ISTM and CDC*)”, foram reportados 401 casos de infecção por *Schistosoma* em 12 países da Europa, todos importados de países endêmicos (Jauréguiberry *et al.*, 2010).

A presença de quadros clínicos pouco específicos diminui a possibilidade de um diagnóstico correto e de uma intervenção eficaz, principalmente em países com escassos recursos de saúde, tornando difícil ter uma noção real do problema ao nível nacional e consequentemente ao nível mundial. Em áreas endêmicas, as prevalências mais elevadas são encontradas em crianças dos 8 aos 15 anos, período em que existe maior eliminação de ovos nas fezes, constatando-se após a adolescência uma diminuição da carga parasitária. Esta redução poderá ter origem num menor contacto com água contaminada e/ou por fatores imunológicos após a morte natural destes helmintas no organismo (Gryseels, 2012; Conlon, 2005).

Em zonas endêmicas de *S. mansoni*, apesar de várias espécies de mamíferos poderem ser infetadas, o ser humano é considerado o único responsável pela manutenção do ciclo de vida deste parasita (Vitorino *et al.*, 2012)

Dependendo da espécie, os ovos são a principal causa desta doença, ao serem depositados nos vasos sanguíneos em redor do intestino ou da bexiga e noutros órgãos. A schistosomose intestinal não apresenta um quadro específico. A sintomatologia mais comum apresenta-se na forma de diarreia, sangue nas fezes, dor abdominal e o aumento do fígado num estado mais avançado da doença. A schistosomose urogenital tem como principal sinal clínico a hematuria.

A schistosomose urogenital já existiu em Portugal, mas a sua erradicação foi conseguida na década de 1950, tendo sido encontrados *Bulinus contortus*, *B. truncatus*, e *Planorbium metidjensis*, hospedeiros intermediários de *S. haematobium*. (Berry *et al.*, 2014).

1.2 Os parasitas (*Schistosoma* spp.)

1.2.1 Classificação taxonómica

Classificação taxonómica de *Schistosoma* spp.

Filo Platyhelminthes

Classe Trematoda

Sub Classe Digenea

Ordem Strigeiformes

Família Schistosomatidae

Sub Família Schistosomatinae

Género *Schistosoma*

Espécie *Schistosoma haematobium* (Bilharz, 1852)

Schistosoma mansoni (Sambon, 1907)

Schistosoma japonicum (Katsurada, 1904)

Schistosoma intercalatum (Fisher, 1934)

Schistosoma mekongi (Voge *et al.*, 1978)

As cinco espécies de *Schistosoma* que mais parasitam o homem podem ser divididas em 3 grupos de acordo com a localização do seu esporão: ovos com esporão terminal (*S. haematobium* e *S. intercalatum*), ovos com esporão lateral (*S. mansoni*) e ovos com esporão rudimentar ou vestigial (*S. japonicum* e *S. mekongi*) (John *et al.*, 2012) (Fig. 3).

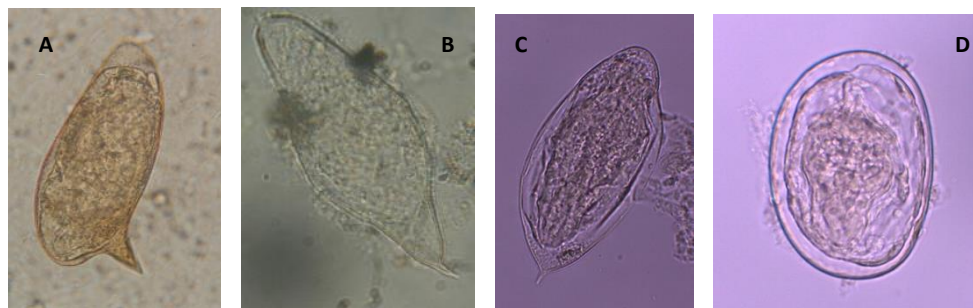


Figura 3 - Ovo de *S. mansoni* B - Ovo de *S. intercalatum* (originais Pedro Ferreira) C - Ovo de *S. haematobium* D - Ovo de *S. japonicum* (originais de Mariana Silva).

1.2.2 Ciclo de Vida e Características Morfológicas

O ciclo de vida do parasita do género *Schistosoma* é di-heteroxeno, ou seja, com 2 hospedeiros, um definitivo e outro intermediário. É um parasita dióico, no hospedeiro vertebrado, possuindo dois sexos distintos (Pearce & MacDonald, 2002). A infeção por este helminta é feita diretamente pelo contacto das formas infetantes do parasita com a superfície do hospedeiro. No hospedeiro definitivo são parasitas intravasculares (Thors *et al.*, 2006).

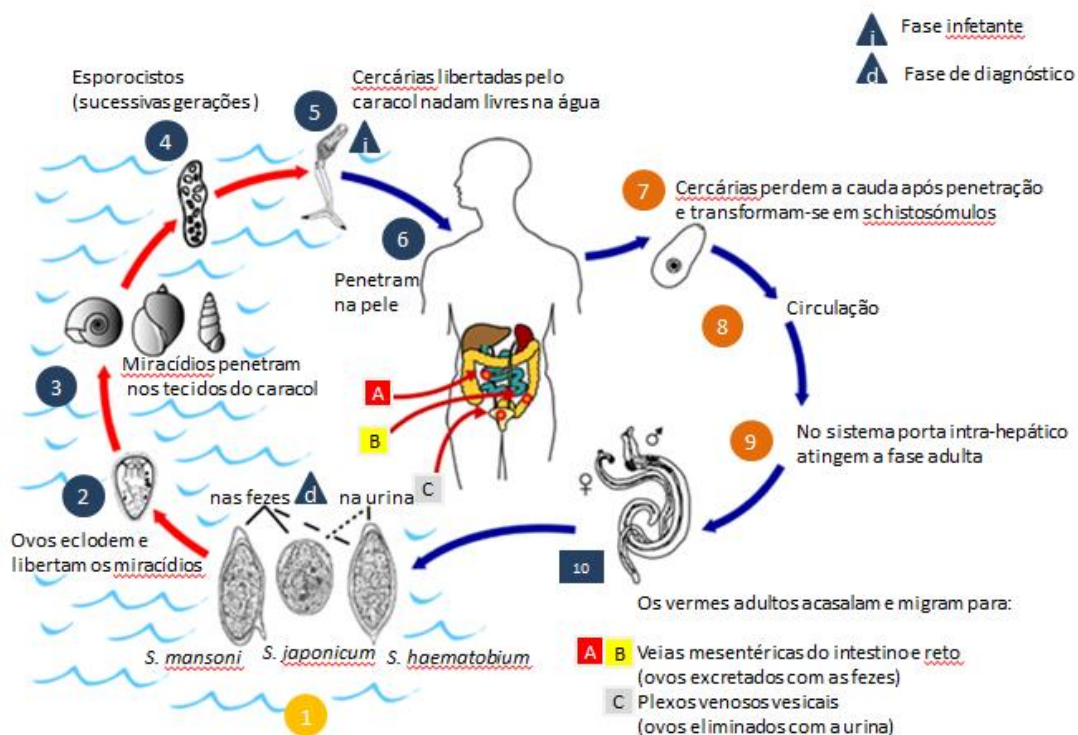


Figura 4 - Ciclo de vida de *Schistosoma* spp. (Adaptação do Centro de Controlo e Prevenção de Doença - CDC).

O ciclo de vida (Fig.4) deste parasita inicia-se pela produção de ovos já embrionados, que são eliminados com as fezes ou urina do hospedeiro definitivo, dependendo da espécie de *Schistosoma* em causa. Cada fêmea pode libertar centenas (*S. mansoni*, *S. haematobium*, *S. intercalatum* e *S. mekongi*) ou milhares (*S. japonicum*) de ovos por dia (Rey, 2010; Hams *et al.*, 2013). Os ovos possuem entre 100 a 180 µm e apresentam forma e localização do esporão próprios de cada espécie. A maioria destes ovos fica presa em diversos órgãos no decorrer do seu trajeto (Hams *et al.*, 2013). Por mecanismos próprios e com a ajuda do sistema imunitário no hospedeiro, cerca de um terço dos ovos têm a capacidade de migrar dos vasos sanguíneos até ao lúmen do

intestino ou da bexiga e serem excretados para o exterior (Poulain-Godefroy *et al.*, 1996) (Fig. 4 ①).

Os ovos ao entrarem em contacto com água doce (em condições de temperatura e luminosidade adequadas) eclodem e libertam larvas ciliadas denominadas de miracídios que são a forma infetante para o hospedeiro intermediário (molusco de água doce), que é específico para cada espécie de parasita (Gryseels, 2012; Hams *et al.*, 2013). Os miracídios nadam ao movimentar os seus cílios e podem manter atividade infetante durante 8 a 12 horas (Fig. 4 ②). Ao encontrar um hospedeiro intermediário compatível, o miracídio penetra o tecido do molusco dando início á fase assexuada do seu ciclo de vida (Rey, 2010; Gryseels, 2012). (Fig. 4 ③). Nesta fase, intramolusco, o miracídio dá origem a duas ou três gerações de esporocistos que migram para o hepatopâncreas onde se desenvolvem durante aproximadamente um mês (Fig. 4 ④). No hepatopâncreas os esporocistos diferenciam-se e dão origem às cercárias, forma infetante para os humanos, que são libertadas para o exterior do molusco (Bica *et al.*, 2000) (Fig.4 ⑤). Um único miracídio pode dar origem entre 100 mil a 300 mil cercárias (Carvalho *et al.*, 2008).

A luz e a temperatura são essenciais para a eliminação de cercárias, conseguindo sobreviver até 72h na água à procura de um hospedeiro (Bica *et al.*, 2000; Gryseels, 2012). Ao encontrarem um hospedeiro vertebrado penetram ativamente através da pele, perdendo a cauda bifurcada, dando origem ao schistosomulo, que após entrar na circulação sanguínea migra pelo coração, pulmões e por fim até às veias mesentéricas do intestino ou do plexo vesical, consoante a espécie do parasita, onde ele atinge o estado adulto (Hu *et al.*, 2004; Wilson & Coulson, 2009; Blanchard, 2004) (Fig.4 ⑥⑦⑧⑨). Este percurso no hospedeiro definitivo dura entre 4 a 6 semanas (Rey, 2010).



Figura 5 - Macho e fêmea de *Schistosoma* (original de Mariana Silva).

Os adultos são macroscópicos com tegumentos complexos, apresentando duas ventosas (uma oral e uma ventral) (Rey, 2010). O macho apresenta cor branca, enquanto a fêmea é acinzentada, devido à digestão de sangue, com um corpo mais fino e longo (Carvalho *et al.*, 2008) (Fig. 4 ⑩). Uma particularidade deste parasita é o facto de o macho influenciar o desenvolvimento somático, o sistema reprodutivo e a fertilidade da fêmea

(Carvalho *et al.*, 2008). Em adultos a fêmea e o macho, permanecem intimamente ligados. A fêmea mantém-se alojada no canal ginecóforo do macho, em toda a sua vida adulta (Gray & Ross, 2011) (Fig. 5). O período médio de vida de um adulto é de 3 a 5 anos, mas pode chegar aos 30 anos (Bica *et al.*, 2000).

1.3 Hospedeiro intermediário

Os hospedeiros intermediários são moluscos de água doce (Gastropoda) pertencentes a vários géneros e apresentam uma certa especificidade relativamente à espécie do parasita.



Figura 6 - *Biomphalaria glabrata* (original de Mariana).

- *S. mansoni* é infetante para os moluscos do género *Biomphalaria* (Monéa *et al.*, 2011) (Fig. 6).



Figura 7 – *B. truncatus* (original de Mariana Silva).

- Os moluscos do género *Bulinus* são sensíveis a infeções por *S. haematobium* e *S. intercalatum* (Anastasiou *et al.*, 2014) (Fig. 7).



Figura 8 - *Oncomelania* sp. (<http://en.wikipedia.org/wiki/Oncomelania>).

- *S. japonicum* é infetante para os moluscos do género *Oncomelania* (Mitreva, 2013) (Fig. 8).



Figura 9 - *Tricula aperta* (<http://www.bagniliggia.it/WMSD/HtmSpecies/5226000020.htm>).

- Os moluscos do género *Tricula* são sensíveis a infeção por *S. mekongi* (Usawahanakul *et al.*, 1993) (Fig. 9).

1.4 Patologia e Resposta imunológica

Os parasitas do género *Schistosoma* têm a capacidade de permanecer durante décadas no hospedeiro vertebrado desenvolvendo mecanismos de sobrevivência como a capacidade de manipular e modular a resposta do sistema imunitário deste. Esta manipulação do sistema imunológico do hospedeiro poderá ter consequências negativas como alterar a capacidade de reposta imunitária do hospedeiro a outras infeções (Helmby, 2009).

Na infeção por *Schistosoma* existem duas fases distintas, a aguda e a crónica. A resposta imunológica em cada uma destas fases depende de vários fatores, tais como: a genética do hospedeiro, a sua idade e estado nutricional, a intensidade de infeção, a existência de coinfeções, entre outros (Willson *et al.*, 2009).

Existem três fases do ciclo de vida do parasita do género *Schistosoma*, que induzem diferentes tipos de resposta imunológica: o schistosomulo, o adulto e o ovo.

Fase aguda

A doença apresenta uma fase inicial aguda em que a patologia começa pela penetração das cercárias na pele, causando erupções cutâneas maculopapulares que surgem passadas algumas horas após o contacto com águas contaminadas com cercárias e duram aproximadamente 24 a 72h (Burke *et al.*, 2009). Estas erupções são uma resposta de hipersensibilidade mediada pela imunoglobulina E (Ig E), mais comuns em infeções primárias e infeções pela espécie *S. haematobium* (Conlon, 2005).

Na fase aguda entre os catorze e oitenta e quatro dias após a infeção, pode surgir um quadro clínico com um estado febril debilitante denominado síndrome de Katayama, resultado de uma reação de hipersensibilidade mediada por imuno-complexos contra o parasita em migração e o aparecimento dos primeiros ovos (Burke *et al.*, 2009). Esta síndrome é comum em indivíduos infetados pela primeira vez por *S. mansoni* ou *S. haematobium* e em áreas endémicas de *S. japonicum* (Gryseels *et al.*, 2006).

Esta fase marcada por uma resposta Th1 que se caracteriza pelo aumento da produção das citocinas pró-inflamatórias: Fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), Interleucina-6 (IL-6) (Pearce & MacDonald 2002; Jauréguiberry *et al.*, 2010) e também de Interferão gama (INF- γ) (Jesus *et al.*, 2002; Araújo *et al.*, 2004; Melo *et al.*, 2013). A

citocina TNF- α pode induzir a produção de óxido nítrico em conjunto com macrófagos ativados por INF- γ resultando na morte do parasita (Pearce & MacDonald, 2002). A citocina INF- γ também tem um papel importante na proteção do hospedeiro, pois tem atividade anti-fibrose que influencia a formação dos granulomas (Wilson *et al.*, 2007). A IL-6 está envolvida na produção de IL-4 e na regulação de INF- γ (Pearce & MacDonald, 2002).

Numa infecção em murganhos a IgG_{2a} é considerada um marcador da resposta Th1 (Faveeuw *et al.*, 2002) e está associada a mecanismos de citotoxicidade (Capron *et al.*, 1978).

Fase Crônica

A fase crônica da doença só se inicia depois de dezasseis a vinte semanas após a infecção, a sua patologia está ligada à formação dos granulomas que resulta da resposta imunológica aos ovos libertados pelas fêmeas de *Schistosoma*, que ficam presos na microvasculatura dos órgãos do hospedeiro definitivo (Rumbley *et al.*, 1998).

A schistosomose crônica pode dividir-se nas seguintes formas clínicas: intestinal, hepatointestinal e hepatoesplênica (Caldas *et al.*, 2008) com a exceção de *S. haematobium* que apresenta a forma urogenital.

A forma intestinal resulta da acumulação de granulomas na mucosa intestinal originando sintomas como dor abdominal, perda de apetite e consequente perda de peso acompanhado de variados quadros intestinais (Danso-Appiah *et al.*, 2013; Conlon, 2005). A forma hepatointestinal tem associado os sintomas da forma intestinal, porém mais intensos, e o surgimento de hepatomegália ou seja o aumento do fígado tornando-o palpável (Bica *et al.*, 2000). A forma hepatoesplênica tem como sintomas adicionais uma fibrose periportal severa que levam ao desenvolvimento de hipertensão portal, o aumento do tamanho do baço (esplenomegália) e ascite (Burke *et al.*, 2009; Bica *et al.*, 2000).

A forma urogenital, atribuída a infecções por *S. haematobium*, tem origem no depósito de ovos nas paredes da bexiga e dos ureteres, como consequência da migração dos adultos para os plexos venosos vesicais (Walker, 2011). Aqui a infecção crônica origina a fibrose e calcificação dos tecidos da bexiga e os sintomas derivados são usualmente cólica renal e ureterohidronefrose (Bica *et al.*, 2000).

A fase crónica desta doença pode ser exacerbada com a existência de coinfeções como por exemplo com o Vírus da Hepatite C e o Vírus da Hepatite B que são responsáveis por uma progressão mais rápida e mais severa desta fase (Burke *et al.*, 2009).

Em infeções mais graves podem surgir também formas cardiopulmonares e schistosomose cerebral (Burke *et al.*, 2009; Jauréguiberry *et al.*, 2010; Gryseels, 2012).

A maioria da sintomatologia da schistosomose deve-se à formação de granulomas em torno dos ovos. Os ovos de *Schistosoma* estão em constante excreção de produtos antigénicos promovendo uma resposta imunitária. O encapsulamento dos ovos e a consequente neutralização dos antígenos é fundamental para evitar danos graves nos tecidos (Hams *et al.*, 2013).

A necessidade da proteção do hospedeiro cria um paradoxo de associação, ou seja, o desenvolvimento de uma patologia através do aparecimento de granulomas. O granuloma é uma reação inflamatória granulomatosa, responsável pelo aparecimento de uma resposta imunológica do tipo Th2, que apresenta cinco fases no seu desenvolvimento (Tabela 1). Esta reação é caracterizada como sendo de hipersensibilidade tardia (Raso *et al.*, 1978).

Fases do granuloma	
Etapas	Descrição
Fase reação inicial	Acumulação de neutrófilos e eosinófilos.
Fase exsudativa	Formação de microabcessos, por acumulação de células leucocitárias.
Fase exsudativa- produtiva	Progressiva substituição da zona leucocitária por histiocitos e células epitelióides. Surgem os primeiros fibrócitos.
Fase produtiva	Degeneração do ovo. Fibrócitos e fibras de colagénio desintegram-se.
Fase involutiva	Fibras de colagénio hialinizam. Possível calcificação dos vestígios do ovo. Diminuição dos granulomas.

Tabela 1 - Descrição das 5 fases do granuloma (Adaptado de Burke *et al.*, 2009).

Com o progresso da fase crónica a resposta Th2 vai sofrendo modulação e os granulomas que se vão formando tornam-se mais pequenos (Pearce & MacDonald, 2002).

Na fase crónica, marcada por uma resposta Th2, ocorre o aumento de expressão das citocinas IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13. A IL-4 é indutora da resposta Th2 e fundamental na produção de IL-5 e IL-13. A IL-5 está envolvida no recrutamento de eosinófilos para o granuloma (Malaquias *et al.*, 1997). As citocinas IL-13 e IL-4 têm algumas funções em comum: modelam a expressão de IgE, estão envolvidas na produção de citocinas da resposta Th2 e suprimem a produção de citocinas pró-inflamatórias (Fallon *et al.*, 2000). A IL-13 também já demonstrou ter um papel predominante na produção de colagénio que resulta na fibrose hepática (Pearce & MacDonald, 2002).

A citocina IL-10 é uma das responsáveis pelo controlo da resposta Th1/Th2, que é essencial para a sobrevivência do hospedeiro (Schramm & Haas, 2010).

Na infeção em murganhos a IgG₁ é considerada um marcador da resposta Th2 (Faveeuw *et al.*, 2002) tendo a função de regulação negativa do granuloma e também na morte do parasita (Zouain *et al.*, 2000).

Em áreas endémicas as populações são capazes de desenvolver uma forma de imunidade a reinfeções (imunidade concomitante) atribuída por alguns autores a um balanço favorável à IgE, contra as formas imaturas e adultas de *Schistosoma*, na relação IgE/IgG₄ (Gryseels *et al.*, 2006).

A IgE e a eosinofilia são características da resposta Th2, esta imunoglobulina é responsável pela ativação de eosinófilos que fazem parte da formação dos granulomas e também libertam citotoxinas que atuam contra os schistosomulos. A IgE poderia ser responsável por uma resposta inflamatória letal, mas é regulada pela IL-10 e a IgG₄ que é capaz de bloquear a interação IgE-antigénio (Pinot de Moira *et al.*, 2013).

A sobrevivência do hospedeiro definitivo depende da sua capacidade de equilibrar a resposta Th1/Th2, ou seja, capaz de formar granulomas, mas minimizando a fibrose e a morbilidade durante a fase crónica desta doença.

1.5 Tratamento e Controlo

O controlo da schistosomose passa por várias medidas, envolvendo a quimioterapia da população doente, o controlo dos moluscos hospedeiros intermediários e a criação de meios para impedir a transmissão das formas infetantes para os hospedeiros intermediários e definitivos (Fenwick & Webster, 2006). Estes meios passam pela disponibilização de água potável à população e a construção de estruturas sanitárias de forma a reduzir a morbilidade e interromper o ciclo de vida do parasita (Gray & Ross, 2011; Bica *et al.*, 2000; Nascimento *et al.*, 2013).

Uma das medidas mais importantes de prevenção e controlo é a educação de uma população em zonas de risco de infeção por *Schistosoma*. Em áreas endémicas da doença como é o caso de algumas regiões do Brasil (Pontes *et al.*, 2003), onde a schistosomose por *Schistosoma mansoni* é considerado um grave problema de saúde pública, são utilizadas diferentes campanhas publicitárias para fazer chegar o conhecimento sobre a doença aos habitantes, seja através da televisão ou mesmo através de poster (Fig. 10).

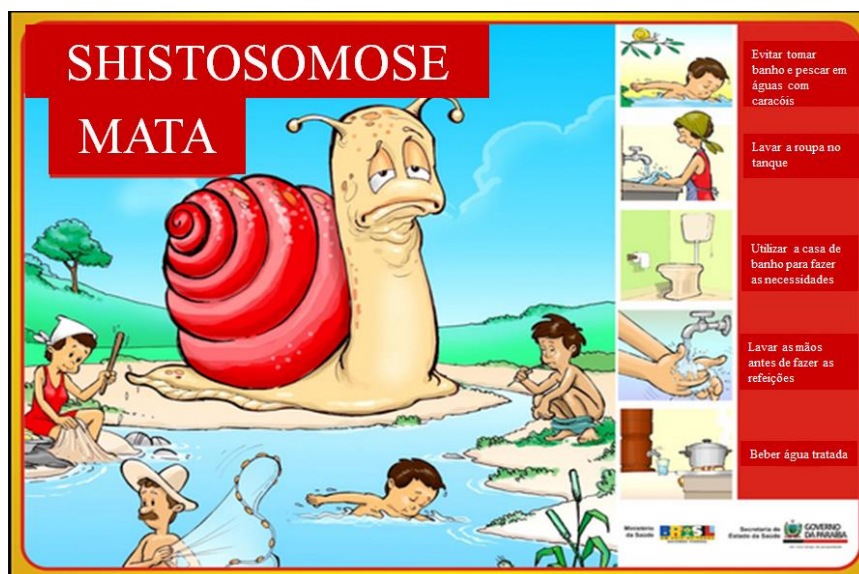


Figura 10 – Poster de uma campanha de consciencialização sobre schistosomose no Brasil. (Adaptado de <http://secsaudesmc.blogspot.pt/2012/04/campanhas-de-endemias-todo-vapor.html>).

Em relação á quimioterapia dois fármacos são utilizados no tratamento da schistosomose: oxamniquine e o Praziquantel (PZQ). A oxamaniquine é eficaz contra todas as fases de infeção por *S. mansoni*. Este fármaco normalmente é bem tolerado,

apresentando apenas alguns efeitos secundários. A utilização de oxamniquine tem-se restringido a países da América do sul, em particular no Brasil (Doenhoff *et al.*, 2008). O PZQ é seguro e eficaz no tratamento das cinco espécies mais importantes de *Schistosoma* sendo assim utilizado há mais de 30 anos como estratégia de controlo em áreas endémicas (Wang *et al.*, 2012; Greenberg, 2013). Esta abordagem tem duas vantagens o fato diminuir a morbilidade causada pela doença no ser humano e também reduzir o número de ovos eliminados para o ambiente. Contudo o PZQ tem uma limitação importante, o facto de não prevenir a reinfeção (Nóbrega de Sousa *et al.*, 2013). É conhecida também a baixa eficácia deste fármaco contra as formas imaturas do parasita (Doenhoff *et al.*, 2008; Fallon *et al.*, 1996). A dose recomendada deste fármaco para infeções por *Schistosoma* é de 40-50 g/Kg, porém são necessárias doses mais elevadas de PZQ para o tratamento de *S. japonicum* e também em algumas áreas endémicas desta parasitose (Cioli & Pica-Mattoccia, 2003; Chai, 2013). Contudo considera-se que este fármaco apresenta taxas de cura elevadas, normalmente acima dos 60% em áreas endémicas (Melman *et al.*, 2009).

O tratamento periódico com PZQ, direccionado para populações em risco, tem sido a estratégia de controlo da OMS para combater a schistosomose (WHO, 2014a; Hotez *et al.*, 2007). Assim o controlo e o tratamento desta parasitose dependem quase totalmente do PZQ tornando-se importante explorar as formas com que possivelmente a resistência a este medicamento se desenvolve e quais os seus efeitos no hospedeiro intermediário e definitivo.

Existem áreas endémicas de schistosomose onde se tem verificado uma diminuição acentuada da suscetibilidade ao PZQ como é o caso do Egito (Ismail *et al.*, 1996), Quênia (Melman *et al.*, 2009) e Senegal (Fallon *et al.*, 1995). Estas regiões partilham o facto de o PZQ ser utilizado em larga escala e repetidamente (Wang *et al.*, 2012).

Apesar de não se verificarem evidências que *S. mansoni* resistente ao PZQ se tenha estabelecido (Norton *et al.*, 2010) podem-se tomar algumas medidas de controlo quanto ao aparecimento da mesma. Estas passam por evitar doses subcurativas, diminuir a frequência dos tratamentos em larga escala, aperfeiçoar a deteção de resistência, melhorar as formas de monitorização do aparecimento de resistência e monitorizar a qualidade do PZQ administrado. Caso existam evidências de resistência deve-se de

imediatamente efetuar um tratamento com outro fármaco eficaz como por exemplo a oxamniquine, para *S. mansoni* (Wang *et al.*, 2012). A resistência a um fármaco é o aumento hereditário da frequência de indivíduos de uma população, que toleram o medicamento, após o contacto desta população com o fármaco (Greenberg, 2013).

Em laboratório já existem resultados em modelos animais, infetados por *S. mansoni*, que indicam que a administração de múltiplas doses subcurativas tornam o parasita cada vez menos suscetíveis ao fármaco e até resistente após alguns ciclos (Fallon & Doenhoff, 1994; Liang *et al.*, 2001; Liang *et al.*, 2010; Li *et al.*, 2011). O aparecimento de resistência também se verifica em trabalhos que realizam tratamentos, com PZQ, em moluscos da espécie *B. glabrata* infetados por miracídios de *S. mansoni* (Couto *et al.*, 2011).

A ação do PZQ nos parasitas ainda não é totalmente compreendida, mas sabe-se que este provoca contrações musculares, lesões no tegumento e alterações metabólicas nos vermes que levam a sua morte (Bricker *et al.*, 1983; Shaw & Erasmus, 1983; Moreau & Chauvin, 2010; Chai, 2013).

Os derivados de artemisinina tem sido indicados como uma possível ajuda no combate contra a schistosomose. Estes derivados são utilizados primariamente no tratamento de malária, mas também possuem propriedades anti-*Schistosoma*, principalmente nas fases imaturas deste parasita (Danso-Appiah *et al.*, 2013; Keiser & Utzinger, 2007). Contudo tem-se evitado a utilização destes derivados para o tratamento de schistosomose em áreas endémicas de malária devido ao risco do aparecimento de resistência (Gryseels, 2012).

Em zonas não endémicas de malária, a utilização dos derivados de artemisinina em combinação com PZQ poderá ser útil para um melhor controlo da schistosomose, sobretudo em zonas com elevadas taxas de infeção, grupos com maior risco de infeção devido à sua idade ou profissão e turistas que tenham estado em contacto com água contaminada por formas infetantes de *Schistosoma* (Doenhoff *et al.*, 2008). Na China já foram utilizados derivados de artemisinina como medicamentos profiláticos contra *S. japonicum* em altura de inundações (Xiao, 2005).

1.6 Diagnóstico

O diagnóstico para a schistosomose pode ser efetuado por exames diretos ou indiretos.

Os exames diretos têm por norma serem mais simples e objetivos e não deixam dúvida da existência do parasita no hospedeiro. Estes exames constam da procura de ovos na urina ou nas fezes ou por biopsia, embora esta seja menos utilizada. Também se pode recorrer à eclosão de miracídios em ovos excretados pelo hospedeiro (Gray & Ross, 2011).

Os testes indiretos são mais dispendiosos, requererem materiais mais complexos e com necessidade de padronização da técnica. Estes podem ser testes imunológicos como a técnica de ELISA, por radiografia, ultrassonografia ou endoscopia (Burke *et al.*, 2009).

Capítulo II – Objetivos

Este trabalho foi integrado na caracterização de uma estirpe de *S. mansoni* à qual foi induzida uma resistência ao PZQ na dose de 120 mg/Kg de peso. Assim foram estabelecidos os seguintes objetivos:

1 Objetivo Geral

Estudar as diferenças de alguns parâmetros morfológicos, imunológicos, hematológicos e histológicos entre a infecção por uma estirpe de *S. mansoni* sensível a PZQ e outra resistente a PZQ (120 mg/kg), em *Mus músculos*, em três tempos de infecção (6, 8 e 10 semanas).

2 Objetivos Específicos

- Determinar e comparar o peso dos murganhos dos dois grupos ao longo da infecção,
- Determinar e comparar o peso do fígado e do baço de murganhos dos dois grupos nos três tempos de infecção,
- Determinar e comparar a carga parasitária dos dois grupos de murganhos ao longo da infecção,
- Determinar e comparar os valores de hemoglobina e hematócrito e número de glóbulos vermelhos, dos dois grupos nos três tempos de infecção,
- Determinar e comparar os valores de IgG₁ e IgG_{2a} nos dois grupos ao longo da infecção,
- Efetuar a análise histológica do fígado e do intestino dos murganhos dos dois grupos nos três tempos de infecção.

Capítulo III – Materiais e Métodos

1 Plano de estudo

Para este estudo foram selecionadas duas estirpes de *S. mansoni*: uma estirpe de Belo Horizonte (SmBH) – Brasil, mantida na UEIPM (GHMM)/IHMT e uma estirpe de SmBH proveniente da original à qual foi induzida resistência ao PZQ na dose de 120 mg/Kg. A estirpe SmBH resistente ao PZQ (SmBHR) selecionada na UEIPM (GHMM)/IHMT, ao exercer uma pressão contínua deste fármaco durante vários ciclos deste parasita.

Assim, foram constituídos dois grupos de quinze murganhos, um infetado pela estirpe SmBH resistente ao PZQ na dose de 120 mg/Kg e outro pela estirpe SmBH sensível ao PZQ.

Cada grupo de murganhos foi colocado em três caixas de cinco murganhos/cada e mantidos no biotério do Instituto de Higiene e Medicina Tropical em condições concordantes com as leis em vigor. Dos cinco animais de cada caixa somente três foram utilizados para este trabalho servindo os restantes murganhos de segurança para qualquer imprevisto que poderia ocorrer durante a experiência. Em cada grupo, foram estudados três pontos, de acordo com o tempo após o dia da infecção: 6, 8 e 10 semanas (Tabela 2). Todos os murganhos foram identificados e zelados até serem eutanasiados.

Estirpe de <i>S. mansoni</i>	Semana de eutanásia após infecção			Número total de murganhos
	6 Semanas	8 Semanas	10 Semanas	
SmBH	3	3	3	9
SmBHR	3	3	3	9

Tabela 2 - Semanas em que os murganhos foram eutanasiados, após infecção por SmBH e SmBHR e número de murganhos utilizados para cada estirpe de *S. mansoni*.

O ensaio foi repetido 3 vezes e portanto foram necessários 27 murganhos para cada grupo.

2 Modelos Animais

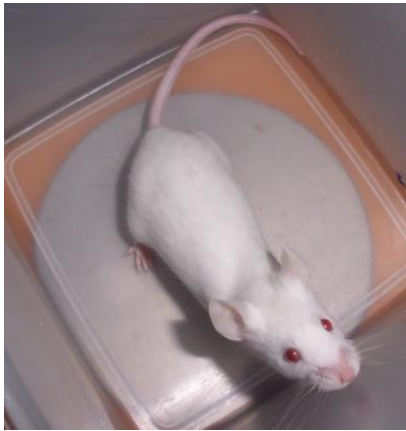


Figura 11 - *Mus musculus* fêmea
(original Mariana Silva).

Neste trabalho foram utilizados murganhos *Mus musculus* fêmeas, devido ao seu comportamento menos agressivo, com aproximadamente 8 semanas de idade (Fig.11), que foram obtidos pelo Instituto de Higiene e Medicina tropical pertencente á Universidade Nova de Lisboa.

Estes murganhos já integraram variados estudos com foco na schistosomose uma vez que são fáceis de manipular em laboratório e por serem de relativo baixo custo. Também são utilizados por possibilitarem o desenvolvimento até à fase adulta/sexual deste parasita, com a eliminação de ovos viáveis e igualmente pelo desenvolvimento da doença se fazer de forma semelhante ao Homem (Carvalho *et al.*, 2008).

3 Infecções Experimentais

3.1 Infecção dos murganhos

Os procedimentos foram realizados de forma igual para os dois grupos estudados.

Obtenção das cercarias



Figura 12 - Exposição
de moluscos à luz
(original Mariana
Silva).

Para a infecção dos murganhos, foram utilizadas cercárias eliminadas por uma estirpe de moluscos de água doce da espécie *B. glabrata*, proveniente de Belo Horizonte – Brasil. Os moluscos, previamente infetados, foram colocados em tubos de Willis (Fig.12) e expostos durante duas horas a uma fonte de luz artificial.

Preparação da dose infetante



Figura 13 - Cercária de *S. mansoni* (original Pedro Ferreira).

Prepararam-se suspensões com uma dose de 100 cercárias (Fig. 13) para cada murganho e colocaram-se em tubos de Willis individuais.

Infeção dos murganhos



Figura 14 - Infeção de murganhos com *S. mansoni* (original Mariana Silva).

Após a marcação dos animais, estes foram colocados numa caixa própria para a infeção de acordo com o protocolo seguido na UEIPM(GHMM)/IHMT. A infeção faz-se pela penetração cutânea das cercárias pela cauda do murganho. Nesta caixa, as caudas dos murganhos permanecem no exterior e são introduzidas nos tubos de Willis que contêm as cercárias, durante duas horas (Fig. 14). Para aumentar a superfície de contato entre a cauda dos murganhos e as cercárias, adicionou-se água até perfazer o total do volume do tubo de Willis.

4 Controlo de Peso



Figura 15 - Pesagem dos murganhos (original de Mariana Silva).

A primeira pesagem foi realizada no dia da infeção numa balança da marca Becken, modelo pesica (Fig.15). Posteriormente os murganhos foram pesados todas as semanas até serem eutanasiados no biotério do IHMT.

5 Controlo da carga parasitária

O controlo da carga parasitária de *S. mansoni* foi efetuado semanalmente desde a quinta semana de infeção até ao dia da eutanásia dos murganhos. A técnica utilizada para este fim foi a de Kato-Katz e tem por objetivo a pesquisa e quantificação de ovos de helmintas. Esta técnica consiste na clarificação das fezes e dos ovos, utilizando uma solução de verde malaquite e glicerina. A técnica de Kato-Katz é uma técnica rápida, de relativo baixo custo e simples de executar, tendo elevada especificidade. A sua sensibilidade varia com o número de amostras analisadas, a intensidade de infeção e a prevalência (Gray & Ross, 2011). Apresenta algumas desvantagens, pois, não deteta infeções recentes e tem uma sensibilidade reduzida em áreas cuja intensidade de infeção é baixa (Bica *et al.*, 2000; Pontes *et al.*, 2002; Gray & Ross, 2011).

Para a realização desta técnica primeiramente procedeu-se à filtração das fezes por uma malha de nylon com o auxílio de uma espátula, de forma a separar os detritos mais volumosos. Em seguida recolheu-se a matéria fecal que passou pela malha de nylon e depositou-se, com a espátula, no orifício central de uma placa perfurada, anteriormente colocada numa lâmina identificada. Depois de preenchido todo o orifício da placa, esta foi retirada e sobre a matéria fecal foi colocada uma tira de celofane embebida numa solução de verde malaquite e glicerina. A tira de celofane foi depois comprimida com uma vareta de vidro até a matéria fecal ficar distribuída uniformemente pela lâmina.

Após repousar cerca de 30 minutos à temperatura ambiente, a lâmina foi visualizada ao microscópio ótico e contabilizando o número de ovos presentes. Com o apoio de uma tabela (Anexos) calculou-se o número de ovos de *S. mansoni* por grama de fezes.

6 Colheita de Amostras

6.1 Colheita de sangue

Foram realizados dois tipos de colheitas sanguíneas:

- Punção cardíaca, no dia em que os animais foram eutanasiados, com o auxílio de uma seringa de 2 ml com EDTA, para o estudo hematológico (Fig. 16).



Figura 16 - Colheita de sangue por punção cardíaca (original de Mariana Silva).

Colheita de duas gotas de sangue da bochecha dos animais no primeiro dia de infecção e posteriormente quinzenalmente, para doseamento das imunoglobulinas.

6.2 Remoção de fígado, baço e intestino



Figura 17 - Colheita de órgãos (original de Mariana Silva).

Os murganhos foram dissecados após a punção cardíaca e eutanasiados por injeção intraperitoneal com uma dose letal de com 20 mg Pentothal®Sódico (Abbott), de acordo com o protocolo seguido na UEIPM(GHMM)/IHMT. Após a pesagem do fígado e do baço numa balança de precisão (Sertorius PT600), colocou-se um pedaço do fígado e do intestino em formaldeído 10% para estudo histológico (Fig. 17).

7 Preparação de Antígeno Solúvel do Ovo de *S. mansoni* (ASO)

O ASO foi preparado a partir dos intestinos de aproximadamente 20 murganhos de cada grupo: infetados com as estirpes sensível e resistente ao PZQ, de acordo com protocolo, seguido na UEIPM(GHMM)/IHMT. Este órgão foi preferido ao fígado, pois

verificou-se em trabalhos anteriores, realizados na UEIPM(GHMM)/IHMT, que a obtenção dos ovos deste parasita era assim mais eficaz (Ferreira, 2004). Após a remoção dos intestinos estes foram limpos, numa lupa estereoscópica, para retirar toda a matéria gorda e fezes, e posteriormente colocados numa solução de 1,2% NaCl (m/v) e incubados durante a noite a 4°C, para eliminar o excesso de sangue.

Passadas as 24 horas os intestinos foram triturados com uma varinha mágica *Braun Multiquick 500* e a solução resultante, diluída numa solução de 1,2% NaCl, foi colocada num copo de fundo cónico durante aproximadamente 20 minutos. Por sedimentação os ovos acumularam-se no fundo e para eliminar o máximo de impurezas realizaram-se diversas lavagens. Na decantação final guardaram-se aproximadamente os últimos 20 ml num recipiente e observou-se ao microscópio.



Figura 18 - Sonicador MSE Ultrasonic Power Unit (original Mariana Silva).

Todas as soluções contendo os ovos de *S. mansoni* foram colocadas no mesmo tubo que foi depois centrifugado até chegar ao volume final de 5 ml. Os ovos presentes foram sonicados no aparelho *MSE Ultrasonic Power Unit* (Fig. 18) com 6 ciclos de 2 minutos, com intervalos de 1 minuto. A amostra depois de sonicada foi colocada num almofariz e coberta com parafilme no congelador durante 24 horas. No dia seguinte a solução foi triturada no almofariz para que, com a ajuda do gelo formado, os ovos que possivelmente ainda permanecessem intactos se fragmentassem. Depois de triturar transferiu-se o sobrenadante para um tubo de 15 ml e centrifugou-se durante 1 hora a 5000 G. O sobrenadante onde se encontra o antigénio (Ag) foi guardado no frigorífico a 4°C.

A concentração do Ag foi determinada pelo método de Bradford, obtendo-se os valores de 225 µg/ml e 163 µg/ml para as estirpes de *S. mansoni* sensível e resistente ao PZQ respetivamente. Assim as soluções antigénicas foram diluídas concentração desejada para o ensaio das imunoglobulinas. As soluções foram congeladas a – 20°C.

8 Doseamento de imunoglobulinas anti-*S. mansoni*

Com o objetivo de avaliar a resposta imunológica humoral dos murganhos ao longo da infecção, foi efetuado o doseamento das imunoglobulinas IgG₁ e IgG_{2a} ao longo do tempo de infecção. A pesquisa de anticorpos anti-*S. mansoni* no soro de murganhos, foi baseada na técnica de ELISA – “*Enzyme Linked Immunosorbent assay*”, descrita por Voller, 1976, com algumas modificações. Esta avaliação foi feita quinzenalmente durante as 10 semanas de infecção, ou seja, às 0, 2, 4, 6, 8 e 10 semanas, perfazendo um total de 256 amostras. No início o número de amostras é superior ao final uma vez que os animais vão sendo abatidos consoante o desenho experimental: 6, 8 e 10 semanas.

Foi efetuado um primeiro ensaio de forma a determinar as diluições dos antígenos (IgG₁ e IgG_{2a}) e dos soros a utilizar. Assim testaram-se as diluições 1/200 e 1/400 dos soros, 1/15000 e 1/30000 de IgG₁ e 1/10000 e 1/20000 de IgG_{2a}. Os resultados indicaram que a melhor diluição para os soros seria de 1/400, para a IgG₁ de 1/30000 e para a IgG_{2a} de 1/10000.

Os soros foram obtidos de sangue total impregnado em papel de filtro. Segundo a técnica descrita por Guimarães, 1984, a eluição de sangue a partir de círculos de papel de 4 cm² em 0,25 ml de PBST resulta numa diluição de 1/5, logo para uma diluição de 1/400 cortaram-se, com um furador de papel, círculos de 6 mm de diâmetro que foram eluídos em 1,413 ml de PBST (PBS com 0,05% Tween 20).

Testaram-se os soros em duplicado assim como os controlos positivos e negativos. As lavagens realizadas ao longo da realização da técnica de ELISA foram efetuadas em triplicado com 200 µl de tampão PBST. O valor de absorvância de cada soro resultou da média dos dois valores lidos no espectrofotómetro, retirando o valor do branco. Para a realização da técnica foram utilizadas placas Maxisorp nunc™.

As placas foram sensibilizadas durante 12 horas a 4°C com 100 µl/poço de solução antigénica (5µg/ml) diluída em tampão carbonato pH 9,6 (15mM Na₂CO₃, 35 mM HCO₃). Seguidamente as placas foram lavadas e depois bloqueadas com 200 µl de albumina bovina a 1%, diluída em PBST, durante 90 minutos.

Posteriormente realizaram-se novas lavagens e colocaram-se 100 µl/poço dos soros na diluição de 1/400, sucedida por uma incubação de 2 horas à temperatura ambiente e seguida por outra incubação de 12 horas a 4°C. Passado o tempo de

incubação efetuaram-se novas lavagens e adicionaram-se 100 µl de imunoglobulina (IgG₁ e IgG_{2a}) anti-mouse conjugada com peroxidase.

Passado 90 minutos á temperatura ambiente foram feitas novas lavagens e foi colocado o substrato cromogéneo (9 mg de ortofenildiamina, em 25 ml de tampão substrato (0,2M Na₂HPO₄, 0,1 de ácido cítrico, pH 5,5) e 25 µl de H₂O₂ a 30 %). Depois incubaram-se as placas, envolvidas em papel de alumínio, no escuro com o substrato cromogéneo, durante 30 minutos. Por fim parou-se a reação com 50 µl de HCl 2N.

A absorvância foi lida a um comprimento de onda de 450 nanómetros num espectrofotómetro *Anthos* 2020.

9 Análise histológica

A análise histológica do fígado e do intestino foi efetuada na unidade de Anatomia Patológica do Centro Hospitalar de Lisboa Central, EPE - Hospital de São José, para se avaliarem as alterações morfológicas nos dois órgãos. As amostras de fígado e intestino foram conservadas em formol tamponado a 10%, para parar os processos biológicos de degradação dos tecidos. Posteriormente foram colocados em cassetes de histologia individuais (Fig. 20 A) e sujeitos a ciclos de concentrações de álcool etílico (70°, 95° e 100°) durante 12 horas, num processador automático de tecidos *TermoShandon* (Fig. 19). Estes ciclos servem para retirar todo o conteúdo aquoso dos tecidos de forma a facilitar o corte da amostra. Os ciclos de álcool etílico foram seguidos de diafanização pelo xilol e por fim, a impregnação dos tecidos em parafina líquida (60°C).



Figura 19 - Processador automático de tecidos *TermoShandon* (original Mariana Silva).



Figura 20 - Sequência para a obtenção de amostras histológicas. (A) Amostras em cassetes de histologia. (B) Molde com amostras impregnadas com parafina. (C) Amostras envolvidas no bloco de parafina. (originais Teresa Lacerda).

O órgão impregnado com parafina foi posteriormente colocado num molde (Fig. 20 B) com parafina formando um bloco (Fig. 20 C) do qual, com o auxílio de um micrótomo de corredeira, se obtiveram amostras com 3 μ m de espessura.

Para a análise morfométrica foi utilizada a coloração clássica Hematoxilina-eosina em que a roxo sobressaem as estruturas basófilas como os núcleos e a rosa as



Figura 21 - Máquina de coloração automática Autostain XL-Laica (original Mariana Silva).

estruturas acidófilas como o citoplasma, permitindo assim observar melhor a constituição dos granulomas. A coloração de Tricrómio de Masson também foi utilizada, mas apenas para algumas amostras selecionadas, de modo a evidenciar as fibras de colagénio coradas de verde. Estas

colorações foram obtidas utilizando o aparelho de coloração automático *Autostain*

XL-Laica (Fig. 21).

9.1 Quantificação, Medição e Classificação de granulomas

Neste estudo foi realizada a quantificação, a medição e a classificação dos granulomas hepáticos e intestinais para os dois grupos.

A quantificação foi efetuada num microscópio ótico, selecionando 6 campos aleatórios por corte histológico de fígado e observaram-se com uma ampliação de 40x (Yoshioka, 2002). Apenas se contabilizaram os granulomas com a presença ou vestígios

de ovo. Depois de feitas as contagens, foi efetuada a média e o resultado foi expresso em número de granulomas por campo observado (Euzébio *et al.*, 2012).

Para a medição dos granulomas presentes no fígado foi necessário utilizar uma régua calibrada para a imagem ampliada 40x, no programa *ProgRes CapturePro* v2.8.8 para Windows 2010. Por cada campo visualizado foram medidos 2 granulomas perfazendo um total de 12 granulomas por corte histológico. Para cada corte calculou-se o diâmetro médio de granuloma, em micrómetros (μm).

Para a classificação da fase de desenvolvimento dos granulomas hepáticos foram utilizados os granulomas medidos anteriormente. Os granulomas foram classificados em cinco fases, de acordo com a distribuição dos eosinófilos e das fibras de colagénio: Reação inicial; Exsudativa; Exsudativa-Produtiva; Produtiva; Involutiva.

10 Determinações Analíticas

10.1 Indicadores hematológicos



Figura 10 - Analisador hematológico *Coulter LH 750*.

As amostras de sangue recolhidas neste trabalho foram processadas num analisador hematológico “*Coulter LH 750*” (Fig. 22). Assim, efetuou-se a contagem do número de eritrócitos e determinados os valores de hematócrito e de hemoglobina de cada amostra.

10.2 Tratamento estatístico dos resultados

Foi utilizado o programa informático “*Statistical Package for the Social Sciences*” (SPSS) versão 20 para Microsoft Windows para a análise estatística dos resultados obtidos neste trabalho.

Após a realização do teste de Shapiro-Wilk verificou-se que as amostras deste estudo apresentavam uma distribuição diferente da curva Normal (Shapiro & Wilk, 1965), optando-se pela realização de testes não paramétricos. O teste não paramétrico de

Mann-Whitney-Wilcoxon foi utilizado para a comparação de dois grupos independentes (Feltovich, 2003). Nos dois testes considerou-se o valor de significância estatística $p < 0,05$ para rejeitar a hipótese nula de igualdade de valores medianos.

Os gráficos utilizados neste trabalho foram gerados no programa informático Excel do Microsoft Office 2010.

Capítulo IV – Resultados

1 Peso total

O peso total dos murganhos infetados com SmBH e dos infetados com SmBHR foi obtido semanalmente ao longo da infeção.

No dia em que os murganhos foram eutanasiados os dois grupos mostraram um aumento do peso em relação á primeira pesagem. O grupo que atingiu maior aumento do peso foi o infetado com SmBH com uma diferença de 2 g. Já os murganhos infetados com SmBHR tiveram um aumento de apenas 1,1 g. Este aumento de peso não foi gradual para ambos os grupos, tendo-se verificado oscilações ao longo das infeções, principalmente no caso do grupo resistente (Fig. 23).

O grupo infetado com SmBHR apresentou o peso inicial mais elevado, 32,4 g, apresentando posteriormente um declínio acentuado na 3ª e, posteriormente, à 8ª semanas do estudo. O grupo infetado com SmBH foi o que apresentou o menor peso inicial com 31,2 g, evidenciando e um aumento do peso relativamente homogéneo com um decréscimo nas 3ª e 7ª semana pós infeção.

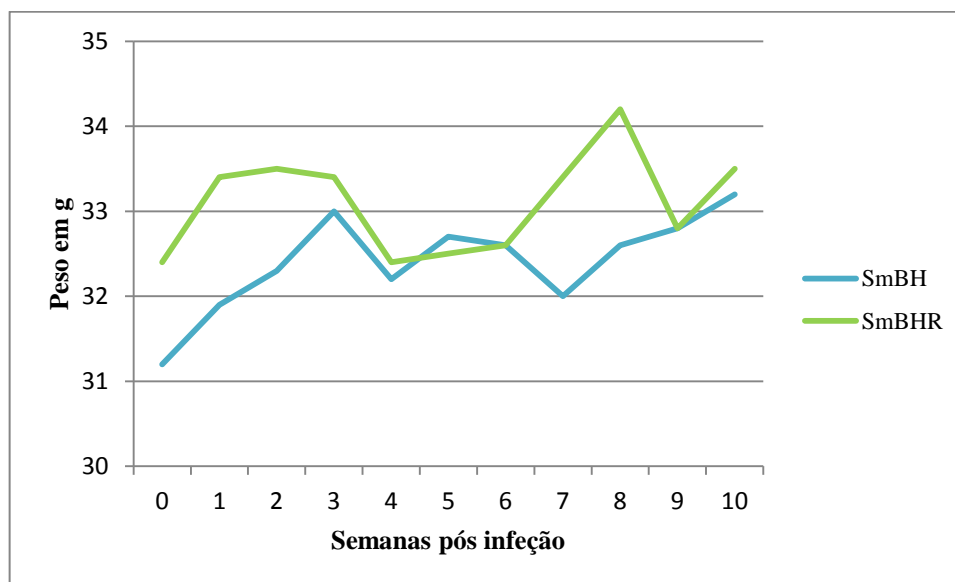


Figura 23 Variação do peso total dos ratinhos ao longo da infeção.

2 Peso do fígado

O peso do fígado dos dois grupos de murganhos estudados foi aumentando sucessivamente com o avançar das semanas após a infecção.

O peso do fígado do grupo infetado com SmBH foi sempre superior, com exceção dos murganhos eutanasiados às oito semanas, em que foi ligeiramente inferior ao outro grupo (Fig. 24).

Verificaram-se diferenças estatísticas significativas em relação ao peso do fígado na sexta (MW: $p = 0,002$) e na décima (MW: $p = 0,012$) semanas após a infecção, entre os murganhos infetados por SmBH e por SmBHR [MW: $p = 0,860$ (semanas 8)].

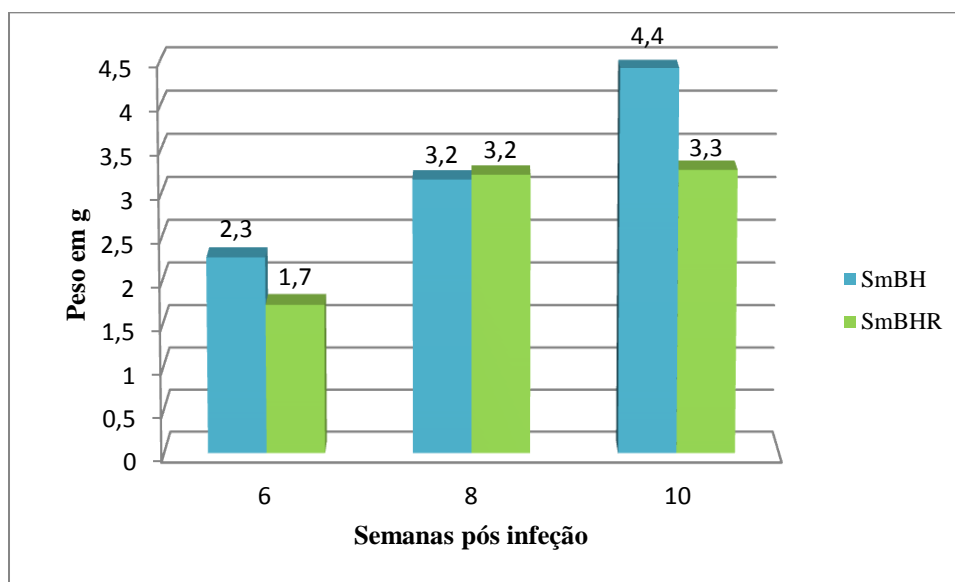


Figura 14 - Variação do peso do fígado ao longo da infecção.

3 Peso do baço

O peso do baço aumentou ao longo do estudo para os dois grupos de murganhos.

Às seis semanas de infecção, o grupo infetado com SmBHR apresentou um peso baço superior ao do grupo infetado com SmBH, porém, às oito e dez semanas de infecção, verificou-se o contrário, em que os murganhos infetados com a SmBH exibiram um peso do baço superior (Fig. 25).

Não se verificaram diferenças estatisticamente significativas em nenhum dos três pontos de avaliação [MW: $p = 0,150$ (semana 6), $p = 0,085$ (semana 8), $p = 0,438$ (semana 10)].

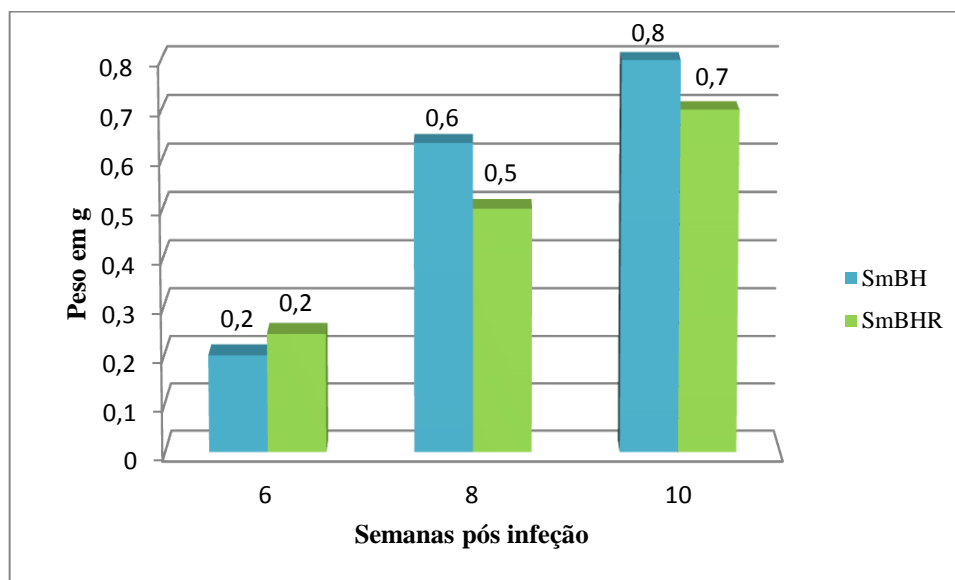


Figura 25 - Variação do peso do baço ao longo da infecção.

4 Carga parasitária de *S. mansoni*

Apesar da avaliação da carga parasitária ter sido efetuada a partir da quinta semana de infecção, apenas foram encontrados ovos após a sétima semana de infecção, para ambos os grupos.

Observou-se um aumento gradual da carga parasitária dos dois grupos de murganhos infetados ao longo do estudo, com a exceção do grupo infetado com SmBH que teve um decréscimo no número de ovos encontrados nas fezes à nona semana. O pico de eliminação de ovos para os dois grupos foi na décima semana (Fig. 26).

Na sétima e oitava semanas após a infecção, foi encontrado um maior número de ovos nas fezes dos murganhos infetados com SmBH, contudo, na nona e décima semanas após a infecção verificou-se o oposto, apresentando o grupo infetado com SmBHR uma maior carga parasitária.

Não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre os dois grupos estudados [MW: $p = 0,421$ (semana 7), $p = 0,447$ (semana 8), $p = 0,545$ (semana 9), $p = 0,262$ (semana 10)]

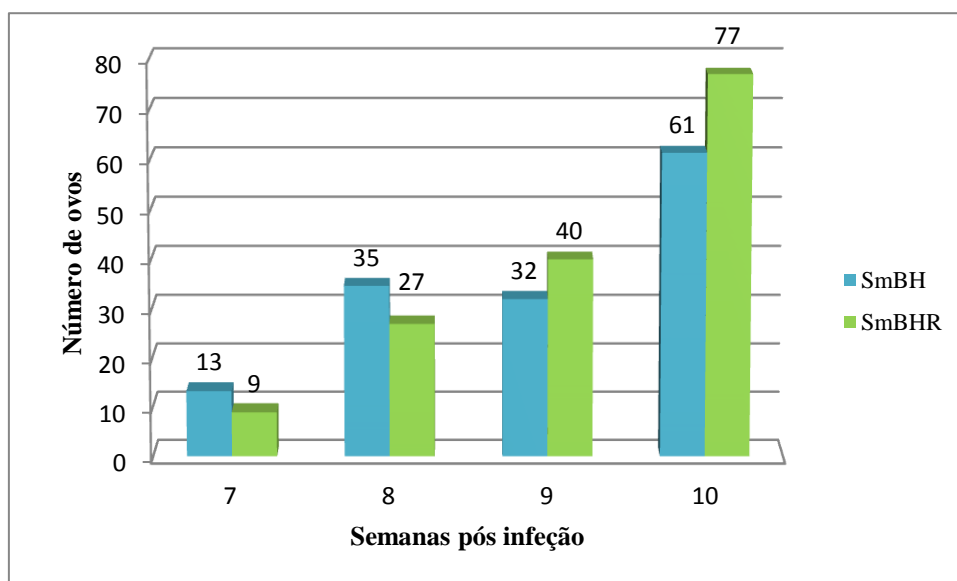


Figura 26 - Variação da carga parasitária ao longo da infecção.

5 Indicadores hematológicos

5.1 Número de Eritrócitos

Verificou-se uma diminuição do número de eritrócitos para os dois grupos de murganhos estudados. Esta diminuição foi mais acentuada da sexta para a oitava semanas, no grupo infectado com SmBH, estabilizando posteriormente (Fig. 27).

O número de eritrócitos entre as duas estirpes analisadas não apresentou diferenças estatisticamente significativas nos três pontos de avaliação. [MW: $p = 0,294$ (semana 6), $p = 0,212$ (semana 8), $p = 0,966$ (semana 10)]

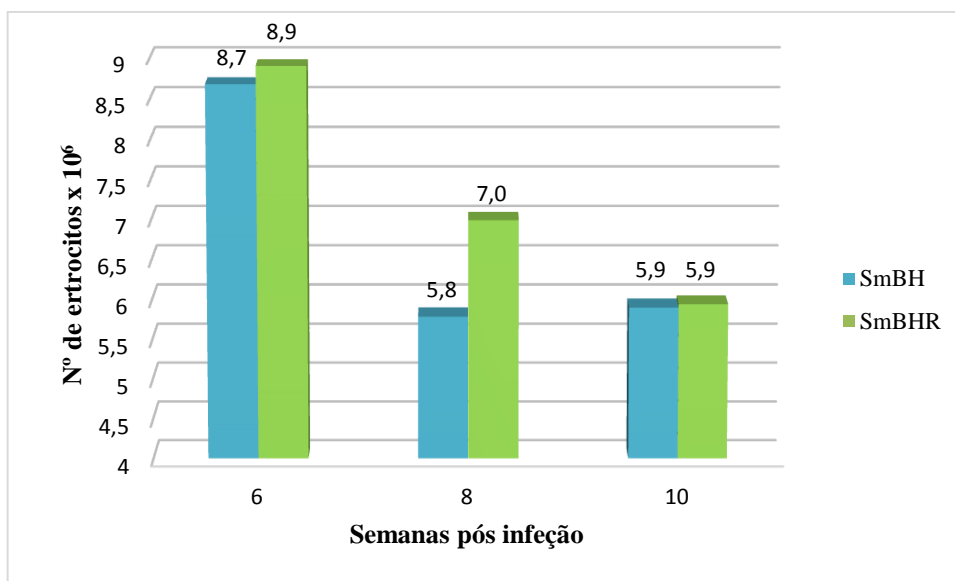


Figura 27 - Número de eritrócitos ao longo da infecção.

5.2 Valores de Hemoglobina

Verificou-se um decréscimo progressivo nos valores de hemoglobina dos dois grupos estudados. Os valores mais baixos de hemoglobina foram atingidos na décima semana de infecção com 9,8 g/dl e 10,1 g/dl para os grupos infetados com SmBH e SmBHR, respetivamente (Fig. 28).

Não se verificaram diferenças estatísticas significativas às seis, oito e dez semanas após infecção entre os dois grupos de murganhos analisados [MW: $p = 0,405$ (semana 6), $p = 0,562$ (semana 8), $p = 0,840$ (semana 10)].

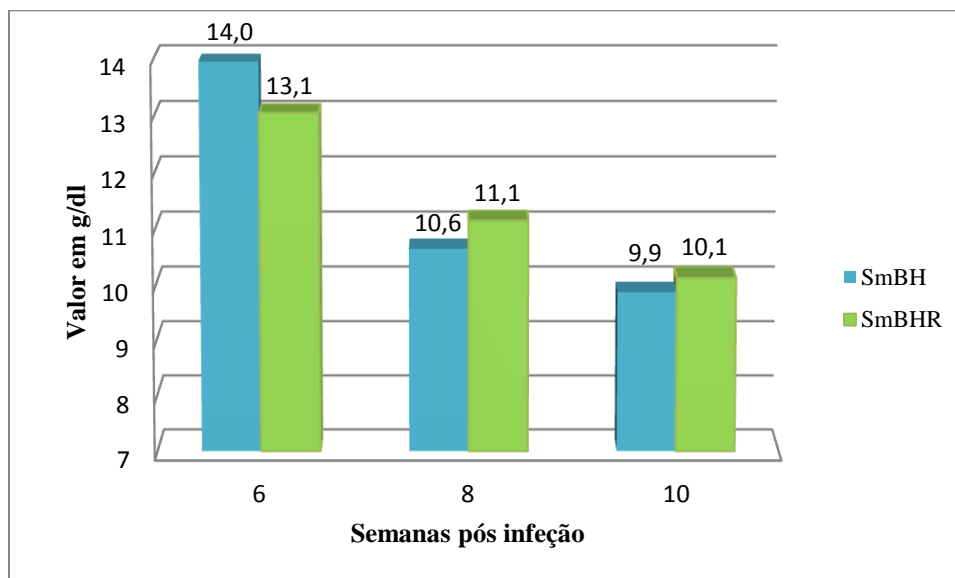


Figura 28 - Variação dos valores de hemoglobina ao longo da infecção.

5.3 Valores de Hematócrito

Os valores de hematócrito sofreram uma diminuição com o desenvolver da doença nos murganhos, ao longo das semanas estudadas. Os valores mais baixos foram obtidos na décima semana, com uma diminuição de 13,9% e de 12,7% em relação à sexta semana, para o grupo infectado com SmBH e SmBHR, respectivamente (Fig. 29). No entanto, não se verificaram diferenças estatisticamente significativas entre a infecção por estas estirpes, nas três semanas de avaliação [MW: $p = 0,715$ (semana 6), $p = 0,736$ (semana 8), $p = 0,871$ (semana 10)].

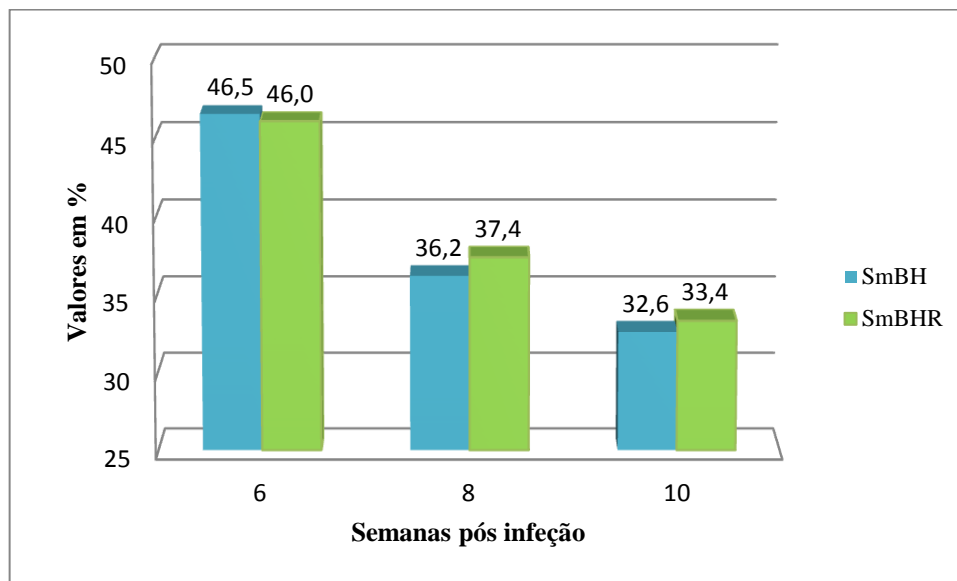


Figura 29 - Variação dos valores de hematócrito ao longo da infecção.

6 Perfil das imunoglobulinas IgG₁ e IgG_{2a}

Ambos os grupos de murganhos estudados exibiram um aumento dos níveis séricos da imunoglobulina IgG₁ durante as dez semanas de infecção. O maior aumento verificou-se desde a sexta semana de infecção. O grupo infectado com SmBHR apresentou sempre valores superiores de IgG₁ ao longo do estudo (Fig. 30). Apenas se verificou uma diferença estatística significativa na quarta semana de infecção [MW: $p = 0,053$ (semana 0), $p = 0,051$ (semana 2), $p = 0,008$ (semana 4), $p = 0,966$ (semana 6), $p = 0,213$ (semana 8), $p = 0,699$ (semana 10)].

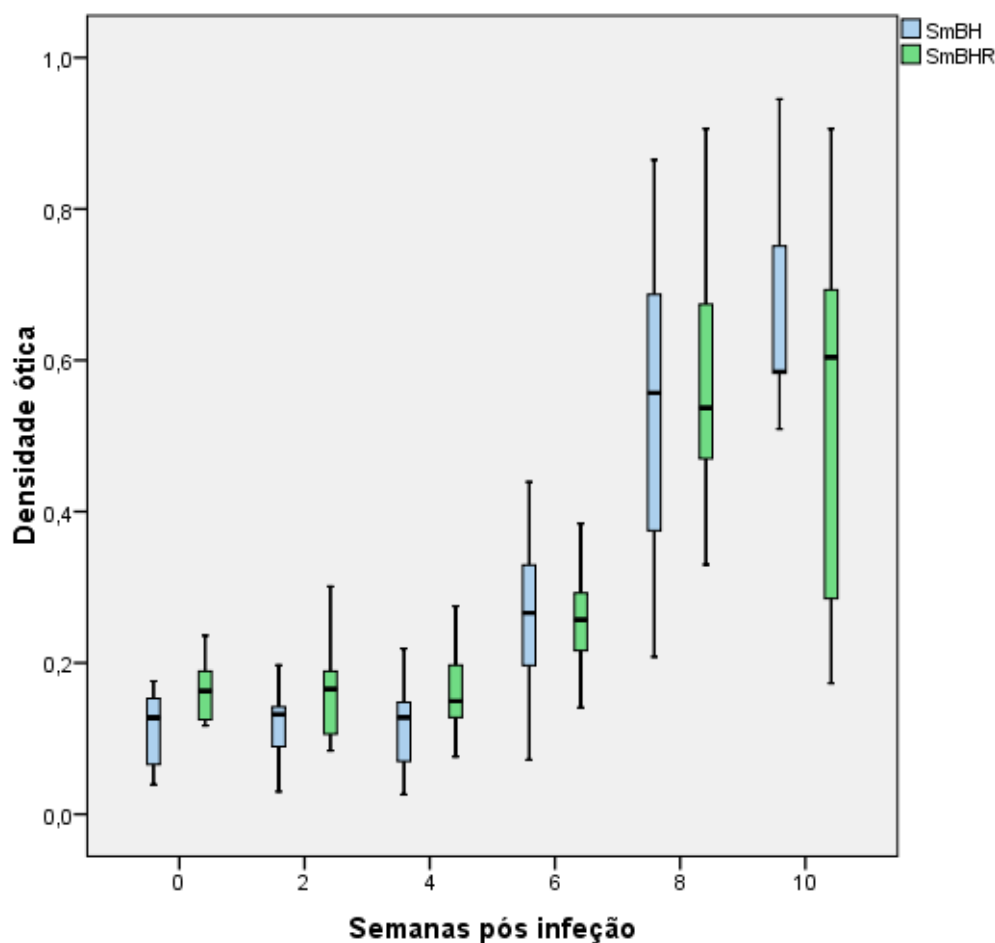


Figura 30 - Níveis séricos de IgG₁ doseados por ELISA ao longo da infecção.

À semelhança da tendência dos valores da IgG₁ também os valores de IgG_{2a} aumentaram com o decorrer das semanas após infecção. O grupo infectado com SmBH apresentou sempre valores superiores ao longo do estudo (Fig. 31).

Os níveis séricos de IgG_{2a} apresentaram sempre diferenças estatísticas significativas ao longo da infecção com exceção das duas últimas semanas [MW: **p = 0,000** (semana 0), **p = 0,000** (semana 2), **p = 0,013** (semana 4), **p = 0,005** (semana 6), **p = 0,259** (semana 8), **p = 0,190** (semana 10)].

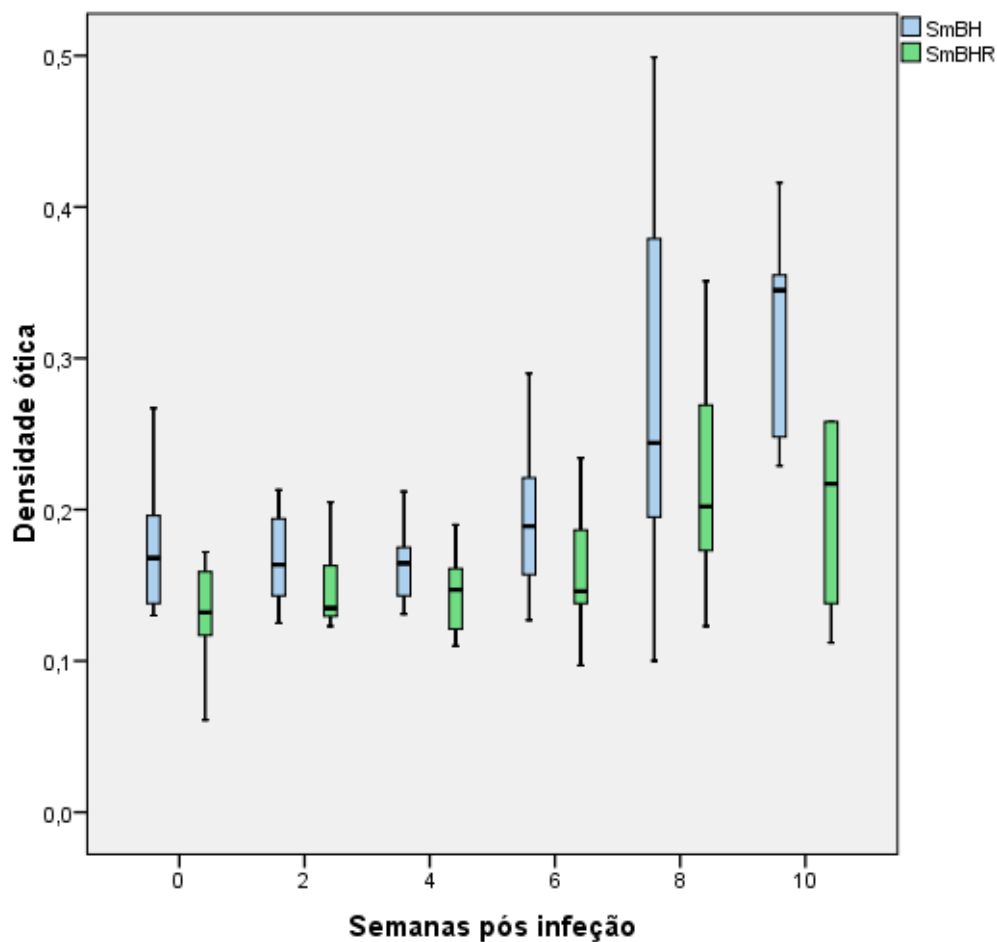


Figura 31 - Níveis séricos de IgG_{2a} detetados por ELISA ao longo da infecção.

7 Análise histológica dos granulomas hepáticos

Segundo a análise histológica do fígado, na fase de reação inicial ainda eram poucos os eosinófilos que rodeavam o ovo e ainda não se observavam fibras de colagénio (Fig. 32).

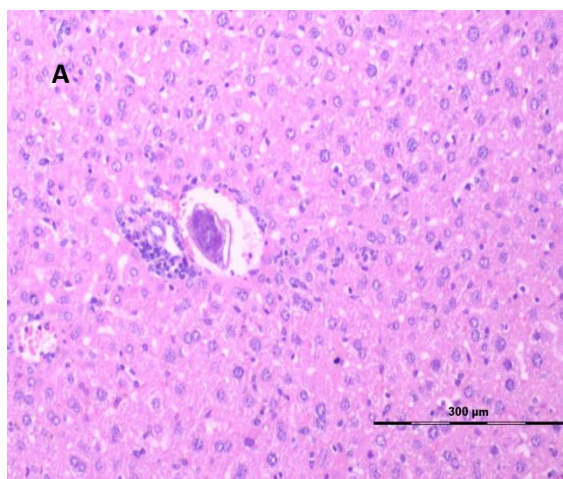


Figura 32 - Granuloma no fígado na fase de reação inicial. (A) Coloração de H&E (objetiva 100x).

Na fase exsudativa foi possível observar a aglomeração de eosinófilos em torno do ovo do parasita, corados de roxo (Fig. 33).

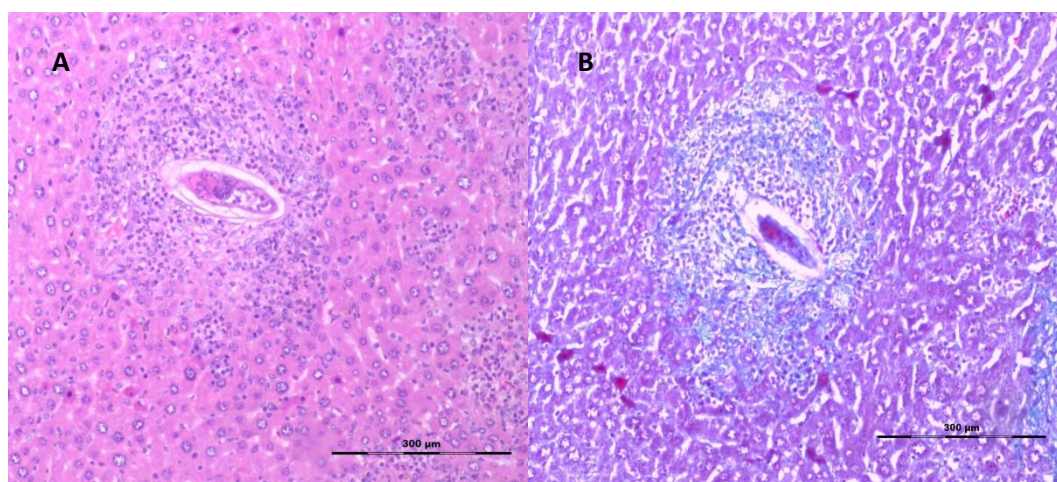


Figura 33 - Granuloma no fígado na fase exsudativa. (A) Coloração de H&E. (B) Coloração de Tricrômio de Masson (objetiva 100x).

Na fase exsudativa-produtiva já se identificaram, principalmente com a coloração de Tricrômio de Masson, fibras de colagénio a envolver o ovo (coradas de azul esverdeado), mas ainda permaneceram visíveis os eosinófilos (Fig. 34).

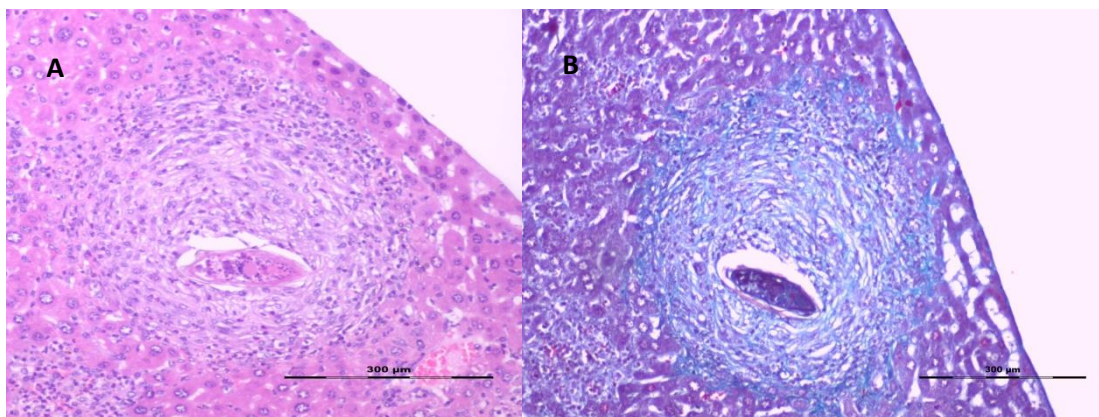


Figura 34 - Granuloma no fígado na fase exsudativa-produtiva. (A) Coloração de H&E. (B) Coloração de Tricrômio de Masson (objetiva 100x).

Na fase produtiva de formação do granuloma hepático as fibras de colagénio foram dominantes em volta do ovo do parasita e a presença de eosinófilos foi mais reduzida, encontrando-se apenas na periferia do granuloma (Fig.35).

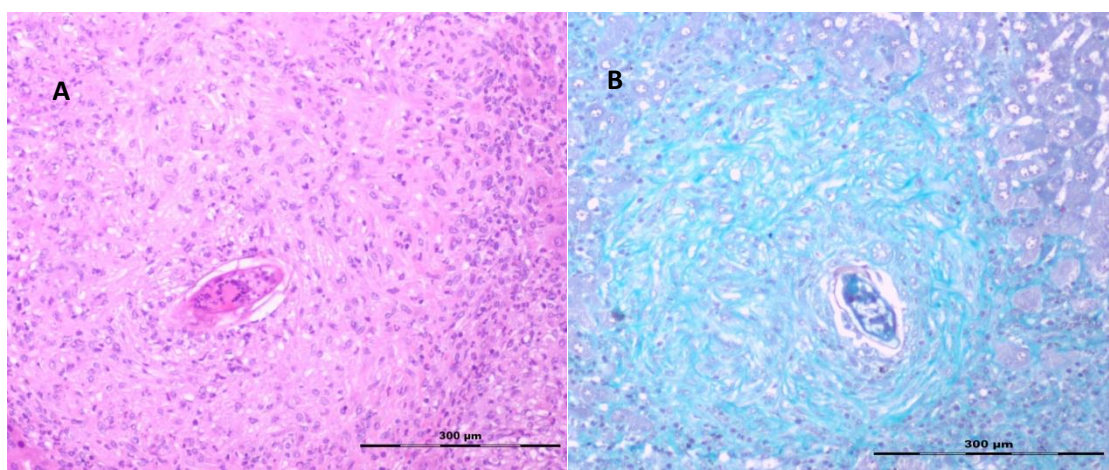


Figura 35 - Granuloma no fígado na fase produtiva. (A) Coloração de H&E. (B) Coloração de Tricrômio de Masson (objetiva 100x).

Em nenhuma das semanas estudadas foram encontrados granulomas na fase involutiva do seu desenvolvimento.

Nos granulomas intestinais foi possível observar os eosinófilos em volta dos ovos. Com a coloração de Tricrómio de Masson também foram visíveis as redes de fibras de colagénio (Fig. 36).

No intestino apenas foram encontrados granulomas a partir da oitava semana de infeção para as duas estirpes. A visualização da fase em que se encontrava o granuloma e o seu tamanho foi dificultado pela constituição do tecido intestinal e também pela menor superfície de tecido disponível para a visualização dos granulomas, em comparação com o tecido hepático.

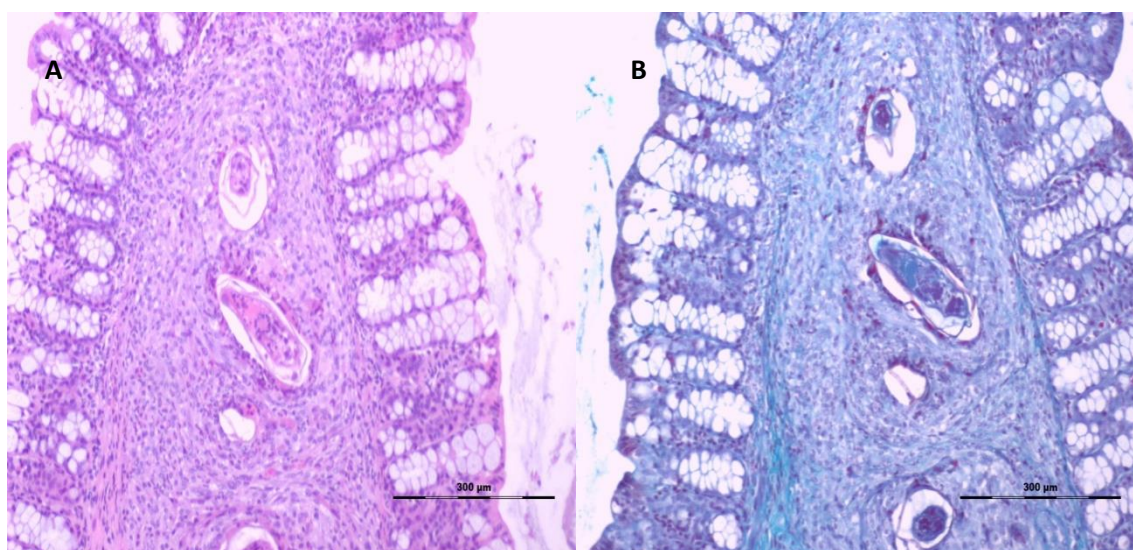


Figura 36 - Granulomas intestinais. (A) Coloração de H&E. (B) Coloração de Tricrómio de Masson (objetiva 100x).

7.1 Quantificação de granulomas

O número de granulomas hepáticos foi aumentando ao longo do estudo, no entanto o maior aumento verificou-se da sexta para a oitava semanas nos dois grupos de murganhos estudados. Nos murganhos infetados com SmBH depois deste aumento, o número de granulomas estabilizou na décima semana, nos infetados com SmBHR observou-se um novo aumento, mas não de forma tão acentuada como da sexta para a oitava semana (Fig. 37).

Não foram encontradas diferenças estatísticas significativas entre os dois grupos estudados [MW: $p = 0,075$ (semana 6), $p = 0,184$ (semana 8), $p = 0,965$ (semana 10)].

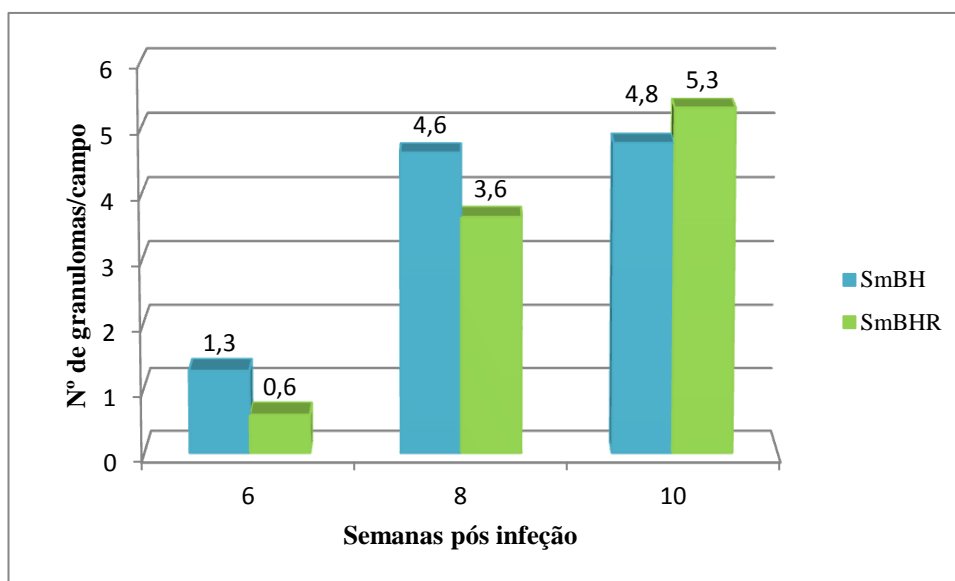


Figura 37 - Número de granulomas no fígado ao longo da infecção.

7.2 Medição de granulomas

O diâmetro médio dos granulomas aumentou ao longo do estudo para os dois grupos de murganhos. No grupo infetado com SmBHR o diâmetro foi superior às seis semanas pós infecção. Posteriormente, na oitava semana, ambas desenvolveram granulomas com diâmetros semelhantes, sendo que na décima semana o grupo infetado com SmBH exibiu um diâmetro médio maior (Fig. 38), apresentando mesmo diferenças estatísticas significativas [MW: $p = 0,859$ (semana 6), $p = 0,627$ (semana 8), $p = 0,031$ (semana 10)].

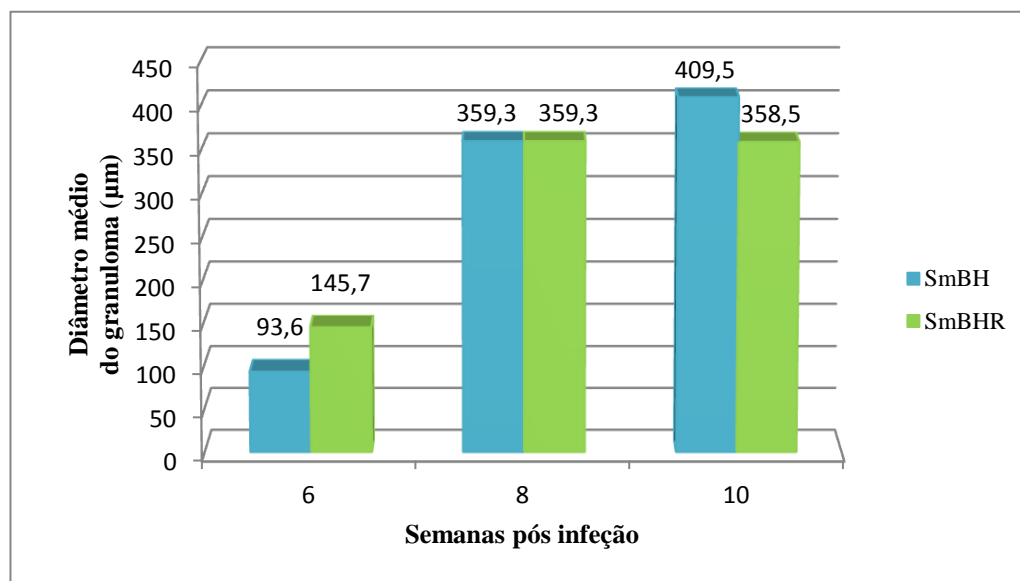


Figura 38 - Diâmetro médio dos granulomas ao longo da infecção.

7.3 Classificação de granulomas

Relativamente às fases de desenvolvimento dos granulomas, observaram-se algumas diferenças no que respeita aos dois grupos analisados. Às seis semanas pós infecção foram visualizados no fígado dos dois grupos de murganhos, granulomas na fase de reação inicial e na fase exsudativa (Fig. 39). A fase de reação inicial esteve mais presente no fígado dos murganhos infetados com SmBH, com diferenças estatísticas significativas (MW: **p = 0,044**) em relação aos infetados com a SmBHR [MW: p = 0,526 (fase exsudativa)].

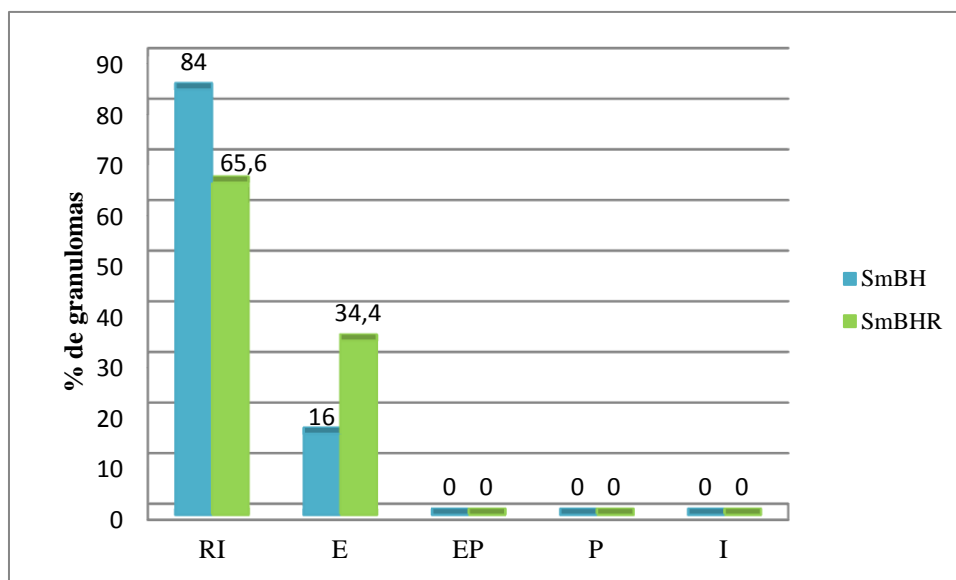


Figura 39 - Percentagem de granulomas nas cinco fases de desenvolvimento às seis semanas de infeção, no fígado. RI- Reação inicial; E- Exsudativa; EP- Exsudativa-Produtiva; P- Produtiva; I- Involutiva.

Nas oito semanas após a infeção foram encontrados granulomas em todas as fases de desenvolvimento, com exceção da fase involutiva, que não se observou em nenhum dos grupos, e da fase produtiva, que não se observou nos murganhos infetados com SmBH.

O grupo infectado com SmBHR foi o que apresentou maior percentagem de granulomas em todas as fases de desenvolvimento excluindo a fase exsudativa-produtiva (Fig. 40).

O grupo infetado com SmBH foi o que apresentou maior número de granulomas na fase exsudativa-produtiva, com diferenças estatísticas significativas (MW: **p = 0,037**) [MW: p = 0,936 (fase de reação inicial), p = 0,053 (fase exsudativa), p = 0,066 (fase produtiva)] (Fig. 40).

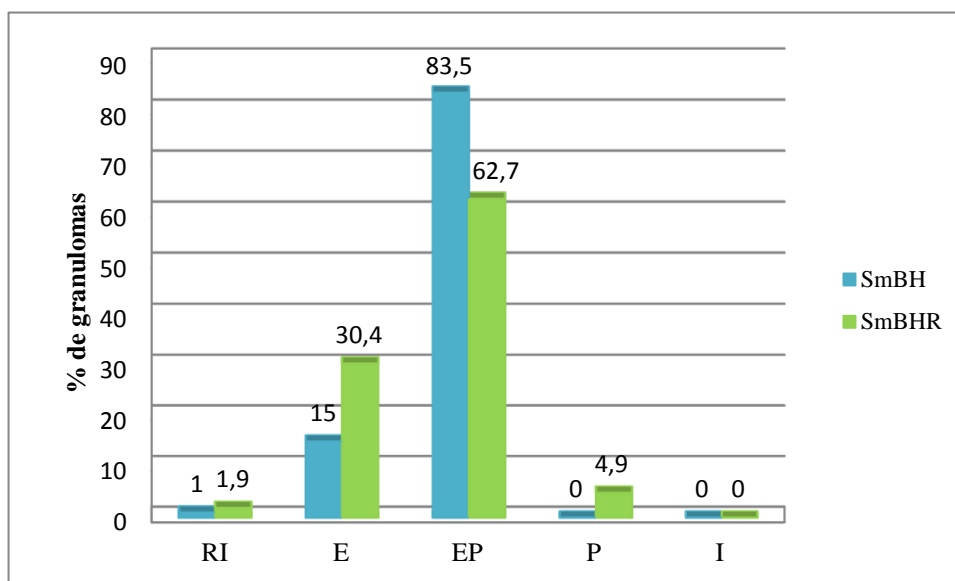


Figura 40 - Percentagem de granulomas nas cinco fases de desenvolvimento às oito semanas de infeção, no fígado. RI- Reação Inicial; E- Exsudativa; EP- Exsudativa-Produtiva; P- Produtiva; I- Involutiva.

Nos murganhos infetados com SmBH, observou-se uma maior percentagem de granulomas às dez semanas nas fases exsudativa e produtiva. Nos murganhos infetados com SmBHR, observou-se uma maior percentagem na fase exsudativa-produtiva para a (Fig. 41).

Não se verificaram diferenças estatísticas significativas entre os dois grupos de murganhos estudados [MW: $p = 0,535$ (fase exsudativa), $p = 0,128$ (fase exsudativa-produtiva), $p = 0,561$ (fase produtiva)].

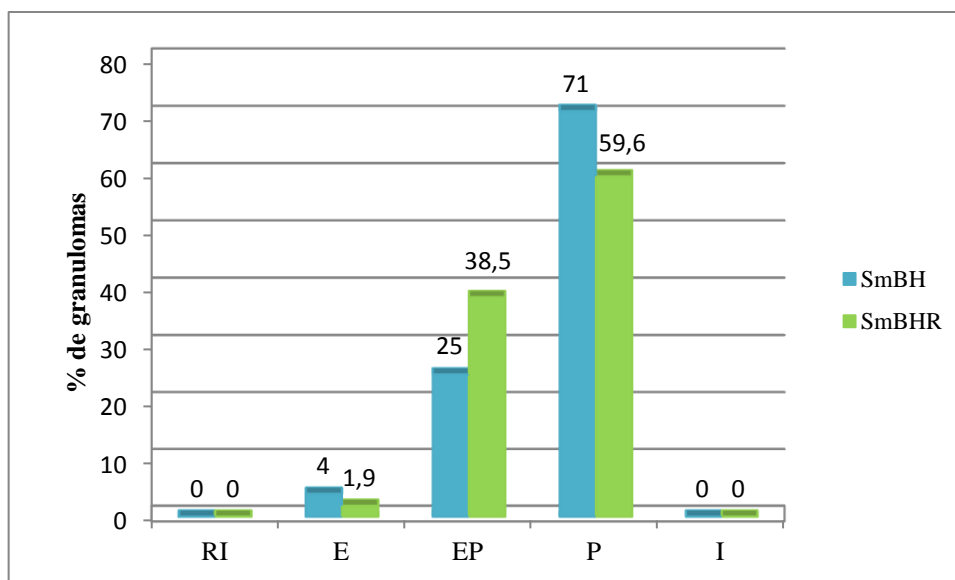


Figura 41 Percentagem de granulomas nas cinco fases de desenvolvimento às dez semanas de infecção, no fígado. RI- Reação Inicial; E- Exsudativa; EP- Exsudativa-Produtiva; P- Produtiva; I- Involutiva.

Capítulo V – Discussão e Conclusões

1 Discussão

A schistosomose é uma parasitose com implicações socioeconômicas graves em várias regiões do globo, afetando milhões de pessoas e sendo responsável por uma elevada morbidade e mortalidade (Kasinathan *et al.*, 2010) (Nóbrega de Sousa *et al.*, 2013).

O presente trabalho consistiu na comparação de vários parâmetros hematológicos, imunológicos, parasitológicos e histológicos na infecção de murganhos *Mus musculus* por uma estirpe de *S. mansoni* de Belo Horizonte sensível ao Praziquantel, mantida em laboratório há mais de 20 anos e uma estirpe proveniente desta cuja resistência ao PZQ foi induzida por pressão de fármaco, ao longo de vários ciclos.

Os murganhos têm sido fundamentais nos mais variados trabalhos relacionados com o estudo da schistosomose devido às suas vantagens de utilização. Para além de serem fáceis de manusear e de relativo baixo custo, apresentam uma taxa de mortalidade por infecção de *S. mansoni*, até ao 50º dia de 10% a 20%. Posteriormente esta taxa tem um aumento significativo devido ao acumular de ovos (Pellegino & Katz, 1968), dependendo sempre do nº de cercárias utilizado na infecção. É conhecido que cerca de 93% das cercárias da estirpe de *S. mansoni* de Belo Horizonte, usada neste trabalho, penetram no hospedeiro (Magalhães & Carvalho, 1973).

Vários estudos realizados no âmbito da resistência de *Schistosoma* ao PZQ revelaram que a perda de sensibilidade do parasita ao fármaco resulta em alterações em todas as fases do seu desenvolvimento (Liang *et al.*, 2001), incluindo alterações morfológicas e no próprio *fitness* parasitário (William *et al.*, 2001; Lamberton, 2005). William *et al.*, 2001 analisaram 6 estirpes de *S. mansoni* provenientes de pacientes com dificuldade de cura após vários tratamentos com PZQ. Destas 6 estirpes apenas 3 mantiveram o seu carácter menos suscetível depois de múltiplas passagens sem pressão terapêutica. Estas estirpes demonstraram uma menor produção de cercárias, diminuíram o tempo médio de vida dos moluscos infetados e aumentaram o período pré-patente no caracol.

Relativamente ao peso total dos murganhos infetados com as duas estirpes de *S. mansoni*, verificou-se um aumento ao longo do estudo. Em ambos os grupos de

murganhos estudados verificaram-se algumas oscilações, sendo estas mais pronunciadas no grupo infetado com SmBHR. O mesmo aumento de peso foi verificado por Simões *et al.*, 2002 em que durante 60 dias este autor identificou um aumento constante do peso dos murganhos infetados por *S. mansoni*. Também Atta *et al.*, 1981 verificou um aumento de peso com o avançar da infeção, mas a partir da 5ª semana o aumento de peso abrandou com o aparecimento dos primeiros ovos. Segundo Couto *et al.*, 2007, os murganhos infetados por *S. mansoni* diminuem o seu ganho de peso total também devido ao início da oviposição.

Neste trabalho verificou-se uma diminuição do peso total dos murganhos à 3ª semana pós infeção, altura em que os parasitas se encontram na fase migratória. Na sétima semana de infeção, quando se detetaram os primeiros ovos nas fezes, os murganhos infetados com SmBH apresentaram uma diminuição do peso total, o que se enquadra nos resultados dos autores citados anteriormente, porém o mesmo não se verificou para a SmBHR. Neste caso esta diminuição surgiu duas semanas mais tarde, o que pode estar relacionado com um atraso no desenvolvimento dos parasitas.

O peso do fígado dos murganhos nos dois grupos foi aumentando ao longo da infeção. Este aumento foi gradual relativamente à infeção pela SmBH, já na infeção com a SmBHR, o maior aumento de peso ocorreu à oitava semana e depois estabilizou até à décima semana. Segundo Lopes *et al.*, 2006, ocorre um aumento relevante do fígado à oitava semana de infeção, o que está de acordo com os resultados obtidos.

Verificaram-se diferenças estatísticas significativas entre as duas estirpes às 6 e às 10 semanas após infeção. Os valores mais baixos nestas duas semanas foram observados com a SmBHR. Uma possível explicação para o menor peso do fígado nos murganhos infetados pela SmBHR é dada por William *et al.*, 2001 e por Webster *et al.*, 2008, que sugerem que a diminuição da sensibilidade ao PZQ pode originar um custo biológico a esta estirpe que de alguma forma diminua o seu impacto no hospedeiro.

Os danos que se verificam no fígado são causados pelos ovos que são transportados pela corrente sanguínea e que ficam retidos nos capilares deste órgão. Com o acumular de ovos vão-se desenvolvendo áreas de fibrose cada vez maiores, que se fundem diminuindo a área funcional do fígado, e levam à hipertensão portal e à esplenomegalia (Andrade, 2009; Rey, 2010). A acumulação de ovos também provoca o

bloqueio de vasos e a perda de elasticidade que é responsável pela dilatação da veia porta e simultaneamente faz com que dilatam as artérias hepáticas que forçam a formação de novos capilares, resultando assim no aumento do peso do fígado (Cook & Zumla, 2003).

Os resultados obtidos para o peso do baço não apresentaram significado estatístico relativamente às duas estirpes de *S. mansoni*. Os dois grupos de murganhos apresentaram um aumento do peso do baço ao longo do estudo. O aumento de peso do baço está em parte relacionado com o aumento do peso do fígado e, inclusive nos murganhos infetados com SmBH, o peso destes órgãos foi superior ao observado no outro grupo. A hepatomegalia causa hipertensão na veia porta, resultando no aumento e congestionamento do baço (Rey, 2010). Assim, uma vez que se verificou o aumento do fígado, para as duas estirpes ao longo das semanas de infeção já era espectável também um aumento do baço. O aumento do baço também está associado à crescente quantidade de substâncias imunogénicas libertadas no decorrer da infeção por *S. mansoni*, pois é o maior órgão linfático com importantes funções imunológicas (Rey, 2010).

O peso do baço dos murganhos de ambos os grupos, às 8 semanas apresenta concordância com os valores obtidos por Zanotti-Magalhães & Magalhães, 1995.

O peso do baço dos murganhos que não ficaram infetados neste trabalho foi sensivelmente de 0,1 o que significa um aumento aproximadamente de 2, 6 e 8 vezes na 6^a, 8^a e 10^a semana, respetivamente, para os dois grupos.

A carga parasitária analisada neste trabalho pela técnica de Kato-Katz foi uma boa forma de confirmar e controlar a evolução da doença uma vez que é uma técnica quantitativa.

O número de ovos nas fezes foi superior nos murganhos infetados com SmBH à sétima e oitava semanas e, posteriormente, foi menor à nona e décima semanas após a infeção. Não foram encontradas diferenças estatísticas significativas para a carga parasitária, entre os dois grupos estudados. Este resultado também foi obtido por William *et al.*, 2001 que não detetou diferenças entre a carga parasitária de estirpes sensíveis e com reduzida sensibilidade ao PZQ.

Para ambos os grupos a eliminação de ovos só foi detetada a partir da sétima semana de infecção. Este resultado está de acordo com o descrito por Simões *et al.*, 2002, em que só foram detetados ovos nas fezes no 43º dia após a infecção. A eliminação de ovos nesta fase é previsível, pois a maturação para a fase adulta deste parasita dá-se entre as 5ª e a 6ª semanas (Pearce & MacDonald, 2002) e só depois começa a eliminação dos ovos. Com o passar das semanas verificou-se um aumento dos ovos eliminados o que está de acordo com os resultados obtidos por Euzébio *et al.*, 2012 e Simões *et al.*, 2002, que verificaram o mesmo até aos 55 dias após infecção. Segundo Simões *et al.*, 2002 após este aumento segue-se uma diminuição destes valores, causada pelo acumular de ovos nos tecidos.

Relativamente aos parâmetros hematológicos avaliados neste trabalho, número de eritrócitos, níveis de hemoglobina e valor de hematócrito, verificou-se uma diminuição progressiva com o decorrer da infecção, para os dois grupos estudados.

Apesar de não se verificarem diferenças estatisticamente significativas entre os murganhos infetados com SmBH e os infetados com SmBHR, neste último grupo os valores foram quase sempre superiores ao longo das semanas de infecção, excetuando às 6 semanas, em que os valores de hemoglobina e hematócrito foram inferiores.

Existem alguns fatores potencialmente responsáveis pelo decréscimo dos valores analisados. A perda de sangue nas fezes, pela passagem de ovos da parede do intestino para o lúmen é apontada como uma destas razões (Gryseels, 2012), assim como a formação de pólipos intestinais também pode exacerbar esta perda (Santana & Gomes, 2011).

O aparecimento de anemia também pode resultar do desenvolvimento de esplenomegália, o que se verificou neste estudo, isto porque os eritrócitos ficam presos no baço, o que pode reduzir o total de eritrócitos circulantes e também levar à hemólise destas células (Sturrock *et al.*, 1996).

Segundo Friedman *et al.*, 2005 numa infecção por *Schistosoma* pode ocorrer a destruição dos eritrócitos pelo sistema imunitário do próprio hospedeiro. Este fenómeno acontece, segundo este autor, pelo contacto dos eritrócitos com anticorpos do hospedeiro que leva à sua identificação e eliminação no fígado e no baço.

A anemia também poderá ser explicada pela produção de produtos da resposta inflamatória como o TNF- α e a IL-6 que diminuem a produção de eritrócitos por parte do hospedeiro, diminuindo igualmente a capacidade de absorção de ferro na alimentação (Means, 2000; Ganz, 2002).

A perda de eritrócitos também é feita pela alimentação das fêmeas (Rey, 2010). As fêmeas adultas ao acasalarem quadruplicam a sua ingestão de eritrócitos (Gupta & Basch, 1987).

O facto dos murganhos infetados com SmBHR apresentarem valores quase sempre superiores nos parâmetros hematológicos pode estar relacionado com uma menor agressividade para o hospedeiro devido à debilidade resultante da ação do PZQ no parasita, já anteriormente descrita.

A infeção no murganho é semelhante á infeção em humanos, inicialmente desencadeia-se uma resposta Th1, com produção de IFN- γ e IL-2, direcionada às formas larvares em migração e a antigénios de adultos que é seguida de uma resposta Th2 intensa assim que se inicia a deposição dos ovos. Em murganhos a resposta Th2 não está associada ao desenvolvimento de imunidade protetora específica, mas sim com a patologia desta doença. Durante a resposta Th2 existe a produção de IL-4 responsável pelo desenvolvimento e manutenção da formação de granulomas que é regulada por IFN- γ e indiretamente por IL-12 (Butterworth, 1998).

No presente trabalho foram estudadas duas imunoglobulinas, a IgG₁ e a IgG_{2a}. Segundo Poulain-Godefroy *et al.*, 1996 a IgG₁ está associada a uma resposta Th2 e a IgG_{2a} está associada a uma resposta Th1 (Argiro *et al.*, 1999; Faveeuw *et al.*, 2002). Também de acordo com Poulain-Godefroy *et al.*, 1996 e Coutinho *et al.*, 2010 numa infeção por *S. mansoni* ocorre um aumento de IgG₁, relacionado com o aparecimento dos primeiros ovos do parasita, como resposta ao crescente nível de antigénios produzidos.

No presente estudo, a IgG₁ apresentou o comportamento esperado ao aumentar bastante os seus valores a partir da sexta semana de infeção para os dois grupos estudados, altura em que se verificou o início da eliminação de ovos. Esta imunoglobulina está associada à morte dos parasitas, assim como a regulação negativa

do granuloma, ou seja, reduz a resposta da formação do granuloma (Zouain *et al.*, 2000).

Contudo os níveis de IgG_{2a} permaneceram baixos ao longo da infecção, com um ligeiro aumento desde a sexta semana, obtendo-se os valores mais elevados à décima semana nos dois grupos. Este baixo valor de IgG_{2a} já tinha sido observado anteriormente por Zouain *et al.*, 2000.

Os valores obtidos para IgG_{2a} são concordantes com os obtidos por Pérez Del Villar *et al.*, 2013 em que os níveis desta imunoglobulina até as 9 semanas nunca passaram os 0,2 DO, e só à nona semana de infecção se encontraram valores mais elevados, aproximadamente de 0,4 DO.

Uma vez que a resposta imunológica nesta parasitose é um balanço entre os tipos de resposta Th1/Th2, o aumento prenunciado dos valores de IgG₁ também pode ter como consequência um aumento dos valores de IgG_{2a} que só se verifica depois da deposição dos ovos.

Apesar de neste trabalho se detetarem diferenças estatisticamente significativas entre as duas estirpes, para as duas imunoglobulinas, estas não podem ser consideradas relevantes uma vez que estas diferenças se verificaram desde o tempo zero de infecção, não estando assim relacionadas com a estirpe parasitária. Assim, podemos deduzir que estas diferenças podem estar relacionadas com o número de animais utilizados e não derivadas da resposta à infecção por *S. mansoni*, uma vez que o número de animais no início do estudo é superior.

Uma vez que o estudo terminou à 10^a semana pós infecção, não foi possível observar qual o comportamento da cinética das imunoglobulinas estudadas na fase crónica da doença, no qual seria de esperar uma diminuição dos valores séricos de IgG_{2a} e mais tardiamente da IgG₁.

Os granulomas são uma forma de resposta de hipersensibilidade tardia (Raso *et al.*, 1978) que protegem os tecidos do hospedeiro contra os antigénios libertados pelos ovos do parasita (Hams *et al.*, 2013). A formação do granuloma cria assim um paradoxo, pois é necessário para proteger o hospedeiro, mas também é o principal responsável pela severidade da doença (Ito *et al.*, 2013). O fígado é mais afetado por

granulomas, pois grande parte dos ovos são transportados pela corrente sanguínea até este órgão (Pearce & MacDonald, 2002).

O número de granulomas hepáticos teve o seu maior aumento da sexta para a oitava semana nos dois grupos de murganhos, contudo da 8ª para a 10ª semana verificou-se um aumento do número de granulomas nos murganhos infectados com SmBHR enquanto no outro grupo estabilizou. Este aumento na 8ª e 10ª semanas está em concordância com o resultado obtido na carga parasitária, para o mesmo período, em que se observou maior número de ovos eliminados no grupo infectado com SmBHR. Nas três semanas avaliadas não se verificaram diferenças significativas entre os dois grupos de murganhos, o que se encontra em concordância com os resultados obtidos por William *et al.*, 2001, que verificou não existirem diferenças significativas no número de parasitas adultos recolhidos e no número de ovos presentes no fígado e no intestino.

O aumento do número de granulomas ao longo do período de infecção estudado está de acordo com esperado, pois segundo Tristão *et al.*, 2000 o número de granulomas vai aumentando com o desenrolar da doença.

Foram ainda analisadas as dimensões dos granulomas hepáticos das duas estirpes, mostrando que apenas à 10ª semana de infecção foi encontrada uma diferença estatística significativa. Nesta fase da infecção os granulomas apresentaram diâmetros maiores na SmBH do que na SmBHR, contrariamente ao observado por William *et al.*, 2001. Este resultado pode esclarecer o maior aumento de peso do fígado que se verificou às dez semanas de infecção para SmBH.

A maior dimensão dos granulomas verifica-se na fase aguda da doença (período no qual se insere o presente estudo), à qual está associada uma resposta imunológica do tipo Th2 intensa que é iniciada com o aparecimento dos primeiros ovos (Lopes *et al.*, 2006). A dimensão dos granulomas depende, segundo Stadecker, 1999 do tipo de células T que são recrutadas.

Posteriormente, com o evoluir para a cronicidade, a modelação negativa, induzida pela resposta imunológica do tipo Th1, o tamanho do granuloma tende a diminuir (Raso *et al.*, 1978; Farah *et al.*, 2000; Zouain *et al.*, 2000), algo que não foi possível observar neste trabalho, uma vez que não foi estudado.

Neste estudo os granulomas foram classificados quanto à sua fase de desenvolvimento às 6, 8 e 10 semanas após a infecção. Foram observados granulomas em praticamente todas as fases de desenvolvimento: reação inicial, exsudativa, exsudativa-produtiva, produtiva, com exceção da fase involutiva.

Na sexta semana após infecção verificou-se uma percentagem maior, e estatisticamente significativa, de granulomas em fase de reação inicial no grupo infetado com SmBH. Esta fase é caracterizada pela aglomeração progressiva de macrófagos, neutrófilos e eosinófilos em volta do ovo (Burke *et al.*, 2009; Lichtenberg, 1962). Nesta semana, embora em menor quantidade, também foram encontrados granulomas na fase exsudativa mas, apesar de não apresentar significado estatístico, o grupo infetado com SmBHR apresentou uma maior percentagem de granulomas nesta fase de desenvolvimento do que o grupo infetado com SmBH. A fase exsudativa tem como característica a formação de micro-abcessos, por acumulação de células leucocitárias (Burke *et al.*, 2009, Lichtenberg, 1962). Assim podemos verificar que nos murganhos infetados com SmBHR apesar de apresentar menos granulomas na fase predominante, já evidenciam mais granulomas na fase seguinte dos que os infetados com SmBH. Este resultado é concordante com o diâmetro dos granulomas, que vai aumentando à medida que este se vai desenvolvendo.

Na oitava semana após a infecção verificou-se a existência de todas as fases de desenvolvimento dos granulomas com exceção da fase involutiva. Nesta semana os valores percentuais foram maiores no grupo infetado com SmBHR para as fases de reação inicial e exsudativa. Nesta altura da infecção a maioria dos granulomas encontrados apresentavam-se na fase exsudativa-produtiva para os dois grupos de murganhos, sendo que no grupo infetado com SmBH estes valores foram superiores e estatisticamente significativos. Na fase exsudativa-produtiva as células leucocitárias vão sendo substituídas por histocitos e células epitelióides e na periferia destas, surgem os primeiros fibrócitos (Raso *et al.*, 1978; Burke *et al.*, 2009). Nos murganhos eutanasiados às oito semanas só foram encontrados granulomas na fase produtiva no grupo infetado com SmBHR, Apesar disto a fase dominante é a mesma da verificada no outro grupo, no entanto, ainda apresenta muitos granulomas nas fases de desenvolvimento anteriores.

Na décima semana de infecção só foram encontrados granulomas nas fases exsudativa, exsudativa-produtiva e produtiva. Os granulomas na fase exsudativa tiveram presentes em maior percentagem em ambos os grupos estudados, sendo que foram superiores no grupo infetado com SmBH, mas sem diferenças estatisticamente significativas. Este resultado está de acordo com o obtido com o diâmetro do granuloma, que se mostrou superior neste grupo. Esta fase caracteriza-se pela degeneração do ovo, pela desintegração dos fibrócitos e as fibras de colagénio ocupando a maioria do granulomas e os pelos eosinófilos que ainda permanecem na periferia do granuloma (Burke *et al.*, 2009). Nesta fase, a visualização e classificação dos granulomas foram dificultadas pelo número e elevado diâmetro dos granulomas nos dois grupos.

Os resultados obtidos indicam que os murganhos infetados com SmBH apresentaram as percentagens mais elevadas na fase dominante do granuloma nas três semanas estudadas, observando-se uma progressão linear no seu desenvolvimento, evoluindo de forma esperada.

Apesar dos murganhos infetados com SmBHR terem apresentado alguns granulomas em fases mais avançadas até à décima semana de infecção, verificou-se que mantinham muitos granulomas na fase anterior à predominante na 8ª e 10ª semanas.

Os granulomas presentes no intestino grosso também foram estudados. Só foram encontrados granulomas nos dois grupos de murganhos a partir da oitava semana de infecção. Porém a constituição do tecido intestinal, como a presença de glândulas, que restringe o granuloma, e de várias células como linfócitos e eosinófilos que ficam coradas com as colorações que foram utilizadas, dificultou a visualização dos granulomas, do seu tamanho e constituição não sendo possível a sua análise.

Alguns autores põem em dúvida a existência de resistência do *Schistosoma* ao PZQ fora do ambiente de laboratório. Existe a possibilidade de alguns casos de resistência detetados em certas zonas do mundo estarem na verdade relacionados com a presença de formas imaturas, que sendo menos suscetíveis ao PZQ sobrevivem pós terapêutica (Nóbrega de Sousa *et al.*, 2013) no organismo do hospedeiro fazendo parecer uma falha do fármaco. Outra explicação será que a falha terapêutica não esteja

associada a resistência mas sim a uma reinfeção do hospedeiro, dificultando a percepção da existência de resistência ou não ao PZQ (Gryseels, 2012).

Todavia muitos são os autores que defendem uma crescente diminuição da suscetibilidade de *Schistosoma* ao PZQ, mas há quem afirme que o aparecimento dominante de resistência seja improvável, uma vez que, em zonas como o Egito, Senegal e Quênia com tantos anos de pressão terapêutica, se a estirpe de *S. mansoni* que fosse detentora de resistência a este fármaco fosse totalmente apta seria de esperar que nestas zonas existisse uma rápida predominância desta estirpe, o que não se verifica (King *et al.*, 2000; Fenwick & Webster, 2006; Webster *et al.*, 2008; Fallon *et al.*, 1995; Ismail *et al.*, 1996; Melman *et al.*, 2009; Seto *et al.*, 2011).

A estirpe resistente não sendo totalmente apta para competir contra a estirpe sensível, pode resultar provavelmente num equilíbrio, mas nunca ficando predominante. Outro fator que influenciará bastante o aparecimento de predominância da resistência é a fase de reprodução sexuada deste parasita pois é sabido que o PZQ tem influência no *fitness* parasitário (King *et al.*, 2000; Norton *et al.*, 2010).

Em laboratório também se podem detetar algumas limitações ao aparecimento de estirpes de *Schistosoma* resistentes ao PZQ, como por exemplo algumas estirpes perdem a sua insusceptibilidade ao PZQ o que pode indicar que a resistência não se deve a um só fator (William *et al.*, 2001; Lamberton, 2005; Webster *et al.*, 2008).

Sem a certeza de que é impossível desenvolver-se resistência em áreas endémicas desta parasitose (Fallon *et al.*, 1996; Webster *et al.*, 2008) é um risco para o qual devemos estar preparados para responder rapidamente e eficazmente como por exemplo com o desenvolvimento de novos fármacos (Fenwick & Webster, 2006).

O trabalho realizado teve algumas limitações. Uma destas foi o número de murganhos utilizados para cada estirpe de parasita, que influencia o significado estatístico dos resultados. O tempo máximo de infeção de dez semanas também foi uma limitação pois, não permitiu estudar a fase crónica da doença. Assim, não foi possível estudar todas as fases de desenvolvimento dos granulomas hepáticos, não se encontrando granulomas na fase involutiva do seu desenvolvimento. Para tal, seria necessário o tempo do ensaio ser mais longo para estudar a fase crónica da doença.

O estudo em modelos animais traz consigo também algumas limitações. Dois exemplos são a intensidade de infecção ser mais elevada em modelos animais (Gryseels & Vlas, 1996) e as infecções em humanos serem adquiridas gradualmente ao contrário do que acontece em laboratório (Cheever *et al.*, 2002).

2 Conclusões

Para a comparação das duas estirpes SmBH e SmBHR, mantidas na UEIPM (GHMM)/IHMT, foram utilizados 54 murganhos *Mus musculos*, eutanasiados às 6, 8 e 10 semanas após infecção.

Ambos os grupos apresentaram algumas oscilações do peso total ao longo do estudo, no entanto, sem diferenças estatisticamente significativas.

O peso do fígado foi superior nos murganhos infetados com SmBH apenas às 6^a e 10^a semanas após a infecção, demonstrando diferenças estatisticamente significativas.

O peso do baço aumentou ao longo das semanas após a infecção sem diferenças estatisticamente significativas entre dos dois grupos estudados.

O início do aparecimento de ovos nas fezes dos murganhos aconteceu a partir da sétima semana após a infecção e o número de ovos foi aumentando até ao fim da experiência. O grupo infetado com SmBH apresentou maior carga parasitária até às 8 semanas, sendo que posteriormente, no grupo infetado com SmBHR foi superior até final do estudo.

Relativamente às imunoglobulinas IgG₁ e IgG_{2a}, não se observaram diferenças estatisticamente significativas nos dois grupos de murganhos.

O carácter hematológico dos murganhos também foi estudado e verificou-se uma diminuição dos valores de hemoglobina, hematócrito e número de glóbulos vermelhos, ao longo da infecção, no entanto sem diferenças estatisticamente significativas, entre os dois grupos.

Relativamente aos granulomas hepáticos, observou-se que o número foi aumentando nos dois grupos, sem demonstrar diferenças estatisticamente significativas.

Quanto ao tamanho dos granulomas, que aumentou para os dois grupos de murganhos, ao longo da infecção, detetou-se uma diferença estatisticamente significativa às dez semanas, em que o tamanho do granuloma foi maior na infecção com SmBH.

Quanto à classificação dos granulomas, a SmBH exibiu uma maior percentagem na fase de desenvolvimento predominante, com uma progressão linear dos granulomas, evoluindo de forma esperada, enquanto o grupo infetado com SmBHR manteve muitos granulomas na fase anterior à predominante.

Assim, podemos concluir SmBH demonstrou consequências mais severas para o fígado dos murganhos que a SmBHR, exibindo uma hepatomegalia mais desenvolvida e granulomas hepáticos de maiores dimensões. Estes resultados podem estar relacionado com um retardamento no desenvolvimento do parasita, provocado pela acção do Praziquantel

Para a continuação deste estudo e caracterizar melhor estas duas estirpes seria necessário aumentar o número de murganhos utilizados, de forma e aumentar a certeza estatística dos dados e expandir o número de semanas estudadas principalmente para caracterizar a fase crónica desta parasitose.

Referências Bibliográficas

- ANASTASIOU, E., LORENTZ, K. O., STEIN, G. J., & MITCHELL, P. D. 2014. Prehistoric schistosomiasis parasite found in the Middle East. *The Lancet. Infectious Diseases*, 14, 553–4.
- ANDRADE, Z. A. 2009. Schistosomiasis and liver fibrosis. *Parasite Immunology*, 31, 656–63.
- ARAÚJO, M.I., HOPPE, B.S., MEDEIROS, M., CARVALHO, E.M. 2004. *Schistosoma mansoni* infection modulates the immune response against allergic and auto-immune diseases. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 27–32.
- ARGIRO, L., HENRI, S., DESSEIN, H., DESSEIN, A J., & BOURGOIS, A. 1999. Induction of a protective immunity against *Schistosoma mansoni* with ovalbumin-coupled Sm37-5 coadsorbed with granulocyte-macrophage colony stimulating factor (GM-CSF) or IL-12 on alum. *Vaccine*, 17, 13–8.
- ATTA, A. M., MAGALHÃES, L. A., ALCÂNTARA, F. G., & PAREJA, G. 1981. Esquistossomose mansônica. *Rev. Saúde Públ.*, 15, 72–92.
- BERRY, A., MONÉ, H., IRIART, X., MOUAHID, G., ABOO, O., BOISSIER, J., *et al.* 2014. Schistosomiasis Haematobium, Corsica, France. *Emerging Infectious Diseases*, 20, 1–3.
- BICA, I., HAMER, D. H., & STADECKER, M. J. 2000. Hepatic schistosomiasis. *Infectious Disease Clinics of North America*, 14, 583–604.
- BLANCHARD, T.J. 2004. Schistosomiasis. *Travel Med Infect Dis*, 2, 5–11.
- BRICKER, C., DEPENBUSCH, J., BENNETT, J., THOMPSON, D. 1983. The relationship between tegumental disruption and muscle contraction in *Schistosoma mansoni* exposed to various compounds. *Z Parasitenkd*, 69, 61–71.
- BURKE, M.L., JONES, M.K., GOBERT, G.N., LI, Y.S., ELLIS, M.K., MCMANUS, D.P. 2009. Immunopathogenesis of human schistosomiasis. *Parasite Immunol*, 31, 163–76.
- CALDAS, I.R., CAMPI-AZEVEDO, A.C., OLIVEIRA, L.F.A., SILVEIRA, A.M.S., OLIVEIRA, R.C., GAZZINELLI, G. 2008. Human *Schistosomiasis mansoni*: immune responses during acute and chronic phases of the infection. *Acta Trop*, 108, 109–17.

- CAPRON, M., CAPRON, A., TORPIER, G., BAZIN, H., BOUT, D., JOSEPH, M. 1978. Eosinophil-dependent cytotoxicity in rat schistosomiasis. Involvement of IgG2a antibody and role of mast cells. *Eur J Immunol*, 8, 127–33.
- CARVALHO, O. DOS S., COELHO, P. M. Z., & LENZI, H. L. 2008. *Schistosoma mansoni* e esquistossomose: uma visão multidisciplinar. Rio de Janeiro: Fiocruz.
- CHAI J-Y. 2013. Praziquantel treatment in trematode and cestode infections: an update. *Infect Chemother*, 45, 32–43.
- CHEEVER, A. W., LENZI, J. A., LENZI, H. L., & ANDRADE, Z. A. 2002. Experimental models of *Schistosoma mansoni* infection. *Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 97, 917–940.
- CIOLI, D., PICA-MATTOCCIA, L. 2003. Praziquantel. *Parasitol Res*, 90, 3–9.
- CONLON, C.P. 2005. Schistosomiasis. *Medicine (Baltimore)*, 33, 64–7.
- COOK, G. C., & ZUMLA, A. I. 2003. Helminthic Infections. In W. B. Saunders (Ed.), *Manson's Tropical Diseases* (21st ed., pp. 1431–1471). Londres: Elsevir Science Limited.
- COUTINHO, E. M., OLIVEIRA, S. A. DE, BARROS, A. F. DE, SILVA, F. L., & RAMOS, R. P. 2010. Manson ' s schistosomiasis in the undernourished mouse : some recent findings, 105, 359–366.
- COUTO, J. L. A., VIEIRA, R. C. D. S., BARBOSA, J. M., ROCHA, D. ., & FERREIRA, H. D. 2007. Esquistossomose murina associada à desnutrição alterações histopatológicas no fígado, baço e jejuno. *Rev. Patol. Trop.*, 36, 54–66.
- DANSO-APPIAH, A., OLLIARO, P.L., DONEGAN, S., SINCLAIR, D., UTZINGER, J. 2013. Drugs for treating *Schistosoma mansoni* infection. *Cochrane database Syst Reviews*, 2.
- de JESUS, A., SILVA, A., SANTANA, L., MAGALHAES, A., JESUS, A., ALMEIDA, R., *et al.* 2002. Clinical and immunologic evaluation of 31 patients with acute schistosomiasis *mansoni*. *J Infect Dis*, 185, 98–105.
- DOENHOFF, M.J., CIOLI, D., UTZINGER, J. 2008. Praziquantel: mechanisms of action, resistance and new derivatives for schistosomiasis. *Curr Opin Infect Dis*, 21, 659–67.
- EUZÉBIO, A. A., ZUIM, N. R. B., LINHARES, A. X., MAGALHÃES, L. A., & ZANOTTI-MAGALHÃES, E. M. 2012. Experimental Evaluation of the

- Pathogenicity of Different Strains of *Schistosoma mansoni*. Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases, 2012, 1-7.
- FALLON, P., DOENHOFF, M. 1994. Drug-resistant schistosomiasis: resistance to praziquantel and oxamniquine induced in *Schistosoma mansoni* in mice is drug specific. Am J Trop Med Hyg, 51, 83–8.
- FALLON, P., STURROCK, R., NIANG, C., DOENHOFF, M. 1995. Short report: diminished susceptibility to praziquantel in a Senegal isolate of *Schistosoma mansoni*. Am J Trop Med Hyg, 53, 61–2.
- FALLON, P.G., RICHARDSON, E.J., MCKENZIE, G.J., MCKENZIE, A.N.J. 2000. *Schistosoma* Infection of Transgenic Mice Defines Distinct and Contrasting Pathogenic Roles for IL-4 and IL-13: IL-13 Is a Profibrotic Agent. J Immunol, 164, 2585–91.
- FALLON, R.G., TAO, L., ISMAIL, M.M., BENNETT, J.L. 1996. Focus *Schistosoma* Resistance to Praziquantel : Fact or Artifact ?. Elsevier Inc, 12, 316-320.
- FARAH, I., JOHANSSON, M., LOVGREN-BENGTSON, K., & HAU, J. 2000. *Schistosoma mansoni* in Mice: the Pattern of Primary Cercarial Exposure Determines Whether a Secondary Infection Post-chemotherapy Elicits a T Helper 1- or a T Helper 2-Associated Immune Response. Scandinavian Journal of Immunology, 51, 237–243
- FAVEEUW, C., ANGELI, V., FONTAINE, J., MALISZEWSKI, C., CAPRON, A., VAN KAER, L., *et al.* 2002. Antigen presentation by CD1d contributes to the amplification of Th2 responses to *Schistosoma mansoni* glycoconjugates in mice. J Immunol, 169, 906–12.
- FELTOVICH, N. 2003. Nonparametric Tests of Differences in Medians: Comparison of the Wilcoxon–Mann–Whitney and Robust Rank-Order Tests. Experimental Economics, 6, 273–297.
- FENWICK, A., WEBSTER, J.P. 2006. Schistosomiasis: challenges for control, treatment and drug resistance. Curr Opin Infect Dis, 19, 577–82.
- FERREIRA, P. M. M. C. 2004. Co-infecção *Schistosoma mansoni*/*Plasmodium chabaudi chabaudi* AS em murganços C57BI/6 Estudos hematológicos, imunológicos e parasitológicos. Instituto de Higiene e Medicina Tropical.

- FRIEDMAN, J. F., KANZARIA, H. K., & MCGARVEY, S. T. 2005. Human schistosomiasis and anemia: the relationship and potential mechanisms. *Trends in Parasitology*, 21, 386–92.
- GANZ, T. 2002. The role of hepcidin in iron sequestration during infections and in the pathogenesis of anemia of chronic diseases. *Isr. Med. Assoc. J.*, 4, 1043–1045.
- GRAY, D. J., & ROSS, A. G. 2011. Diagnosis and management of schistosomiasis Early manifestations. *BMJ*, 2651, 1–11.
- GREENBERG, R.M. 2013. New approaches for understanding mechanisms of drug resistance in *Schistosomes*. *Parasitology*, 140, 1534–46.
- GRYSEELS, B. 2012. Schistosomiasis. *Infect Dis Clin North Am*, 26, 383–97.
- GRYSEELS, B., & VLAS, S. J. 1996. Worm burdens in schistosome infection. *Parasitology Today*, 12, 115–119.
- GRYSEELS, B., POLMAN, K., CLERINX, J., KESTENS, L. 2006. Human schistosomiasis. *Lancet*, 368, 1106–18.
- GUIMARÃES, M. C. 1984. Coleta de sangue em papel de filtro para fins de inquéritos seroepidemiológicos. *Rev. Soc. Brasileira de Med. Trop*, 17, 17–45.
- GUPTA, B., & BASCH, P. 1987. The role of *Schistosoma mansoni* males in feeding and development of female worms. *J Parasitol.*, 73, 481–6.
- HAMS, E., AVIELLO, G., FALLON, P.G. 2013. The *Schistosome* granuloma: friend or foe? *Front Immunol*, 4, 89.
- HELMBY, H. 2009. Helminths and our immune system: friend or foe? *Parasitol Int.* Elsevier Ireland Ltd, 58, 121–7.
- HOTEZ, P.J., FENWICK, A. 2009. Schistosomiasis in Africa: an emerging tragedy in our new global health decade. *PLoS Negl Trop Dis*, 3, 485.
- HOTEZ, P.J., MOLYNEUX, D.H., FENWICK, A., KUMARESAN, J., SACHS, S.E., SACHS, J.D., *et al.* 2007. Control of neglected tropical diseases, *The new england journal of medicine*, 357, 1018–27.
- HU, W., BRINDLEY, P.J., MCMANUS, D.P., FENG, Z., HAN, Z-G. 2004. Schistosome transcriptomes: new insights into the parasite and schistosomiasis. *Trends Mol Med*, 10, 217–25.

- ISMAIL, M., METWALL, Y. A., FARGHAL, Y. A., BRUCE, J., TAO, L., BENNETT, J. 1996. Characterization of isolates of *Schistosoma mansoni* from Egyptian villagers that tolerate high doses of praziquantel. *Am J Trop Med Hyg*, 55, 214–8.
- ITO, T., CONNETT, J. M., KUNKEL, S. L., & MATSUKAWA, A. 2013. The linkage of innate and adaptive immune response during granulomatous development. *Frontiers in Immunology*, 4, 10.
- JAURÉGUIBERRY, S., PARIS, L., CAUMES, E. 2010. Acute schistosomiasis, a diagnostic and therapeutic challenge. *Clin Microbiol Infect*, 16, 225–31.
- JEZIORSKI, M.C., GREENBERG, R.M. 2006. Voltage-gated calcium channel subunits from platyhelminths: potential role in praziquantel action. *Int J Parasitol*, 36, 625–32.
- JOHN, R. B., MARK, G., & DIANA, W. 2012. Infectious diseases. In J. W. & Sons (Ed.), *Lecture Notes: Clinical Medicine* (7th ed., p. 396).
- KASINATHAN, R. S., GORONGA, T., MESSERLI, S. M., WEBB, T. R., & GREENBERG, R. M. 2010. Modulation of a *Schistosoma mansoni* multidrug transporter by the antischistosomal drug praziquantel. *FASEB Journal : Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 24, 128–35.
- KEISER, J., UTZINGER, J. 2007. Advances in the discovery and development of trematocidal drugs. *Expert Opin Drug Discov*, 2, 9–23.
- KING, C. H., MUCHIRI, E. M., & OUMA, J. H. 2000. Evidence Against Rapid Emergence of Praziquantel Resistance in. *Emerging Infectious Diseases*, 6, 585–594.
- KING, C., DANGERFIELD-CHA, M. 2008. The unacknowledged impact of chronic schistosomiasis. *Chronic Illn*, 4, 65–79.
- LAMBERTON, P. H. L. 2005. Adaptation and evolution of *Schistosoma* spp. in response to chemotherapeutic pressure. *Transactions of the Royal Society for Tropical Medicine and Hygiene*, 99, 948.
- LI, H., LIANG, Y., DAI, J., WANG, W., QU, G., LI, Y., *et al.* 2011. Studies on resistance of *Schistosoma* to praziquantel XIV experimental comparison of susceptibility to praziquantel between PZQ-resistant isolates and PZQ-susceptible

- isolates of *Schistosoma japonicum* in stages of adult worms, miracidia and cercariae. *Zhongguo Xue Xi Chong Bing Fang Zhi Za Zhi*, 23, 611–9.
- LIANG, Y. S., COLES, G. C., DOENHOFF, M. J., & SOUTHGATE, V. R. 2001. In vitro responses of praziquantel-resistant and -susceptible *Schistosoma mansoni* to praziquantel. *International Journal for Parasitology*, 31, 1227–35.
- LIANG, Y., WANG, W., DAI, J., LI, H., TAO, Y., ZHANG, J., *et al.* 2010. Susceptibility to praziquantel of male and female cercariae of praziquantel-resistant and susceptible isolates of *Schistosoma mansoni*. *J Helminthol*, 84, 202–7.
- LIANG, Y.S., COLES, G.C., DOENHOFF, M.J., SOUTHGATE, V.R. 2001. In vitro responses of praziquantel-resistant and -susceptible *Schistosoma mansoni* to praziquantel. *Int J Parasitol*, 31, 1227–35.
- LICHTENBERG, F. 1962. GRANULOMA FORMATION IN THE UNSENSITIZED LABORATORY MOUSE, 41, 711– 731.
- LOPES, C., RC, V., LR, V., SOUZA, B., & RODRIGUES, I. R. D. C. 2006. Histopathological study of *Schistosoma mansoni* infection in the murine model using the PC (Pará) and LILA (Maranhão) strains. 101, 273–277.
- MAGALHÃES, L. A., & CARVALHO, J. F. 1973. Desenvolvimento do *Schistosoma Mansoni* das Linhagens de Belo Horizonte (MG), e de São José dos Campos (SP) em *Mus musculus*. *Rev. Saúde Públ.*, 7, 285–7.
- MALAQUIAS, L.C., FALCÃO, P.L., SILVEIRA, A. M., GAZZINELLI, G., PRATA, A., COFFMAN, R.L., *et al.* 1997. Cytokine regulation of human immune response to *Schistosoma mansoni*: analysis of the role of IL-4, IL-5 and IL-10 on peripheral blood mononuclear cell responses. *Scand J Immunol*, 46, 393–8.
- MEANS, R. T. J. 2000. The anaemia of infection. *Best Practice & Research Clinical Haematology*, 13, 151–162.
- MELMAN, S.D., STEINAUER, M.L., CUNNINGHAM, C., KUBATKO, L.S., MWANGI, I.N., WYNN, N.B., *et al.* 2009. Reduced susceptibility to praziquantel among naturally occurring Kenyan isolates of *Schistosoma mansoni*. *PLoS Negl Trop Dis*, 3, 504.
- MELO, T.T., ARAUJO, J.M., SENA, I.C., ALVES, C.C., ARAUJO, N., FONSECA, C.T. 2013. Evaluation of the protective immune response induced in mice by

- immunization with *Schistosoma mansoni* schistosomula tegument (Smteg) in association with CpG-ODN. *Microbes Infect.* Elsevier Masson SAS, 15, 28–36.
- MITREVA, M. 2013. The genome of a blood fluke associated with human cancer. *Nat Genet.*, 44, 116–118.
- MONÉA, Y., RIBOUB, A.-C., COSSEAU, C., DUVALA, D., THÉRONA, A., MITTAA, G., & GOURBAL, B. 2011. *Schistosoma mansoni*/Biomphalaria glabrata. *International Journal for Parasitology*, 41, 721–730.
- MOREAU, E., CHAUVIN, A. 2009. Immunity against helminths: interactions with the host and the intercurrent infections. *J Biomed Biotechnol*, 2010, 1-9.
- NASCIMENTO, C., OLIVEIRA, F., OLIVEIRA, R.N., FREZZA, T.F., LÚCIA, V., REHDER, G. 2013. Tegument of *Schistosoma mansoni* as a Therapeutic Target. *Parasit Dis*, 8, 151– 178.
- NÓBREGA DE SOUSA, T., de MENEZES, N.A., ALVES, B.C.F. 2013. “Omics” in the study of the major parasitic diseases malaria and schistosomiasis. *Infect Genet Evol.* Elsevier B.V, 19, 258–73.
- NORTON, A.J., GOWER, C.M., LAMBERTON, P.H.L., WEBSTER, B.L., LWAMBO, N.J.S., BLAIR, L., *et al.* 2010. Genetic consequences of mass human chemotherapy for *Schistosoma mansoni*: population structure pre- and post-praziquantel treatment in Tanzania. *Am J Trop Med Hyg*, 83, 951–7.
- PEARCE, E.J., MACDONALD, A.S. 2002. The immunobiology of schistosomiasis. *Nat Rev Immunol*, 2, 499–51.
- PÉREZ DEL VILLAR, L., VICENTE, B., GALINDO-VILLARDÓN, P., CASTELLANOS, A., PÉREZ-LOSADA, J., MURO, A. 2013 *Schistosoma mansoni* experimental infection in *Mus spretus* (SPRET/EiJ strain) mice. *Parasite*, 20, 27.
- PINOT de MOIRA, A., SOUSA-FIGUEIREDO, J.C., JONES, F.M., FITZSIMMONS, C.M., BETSON, M., KABATEREINE, N.B., *et al.* 2013. *Schistosoma mansoni* infection in preschool-aged children: development of immunoglobulin E and immunoglobulin G4 responses to parasite allergen-like proteins. *J Infect Dis*, 207, 362–6.

- PONTES, L. A., DIAS-NETO, E., & RABELLO, A. 2002. Detection by polymerase chain reaction of *Schistosoma mansoni* DNA in human serum and feces. The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, 66, 157–62.
- PONTES, L.A., OLIVEIRA, M.C., KATZ, N., DIAS-NETO, E., RABELLO, A. 2003. Comparison of a polymerase chain reaction and the Kato-Katz technique for diagnosing infection with *Schistosoma mansoni*. Am J Trop Med Hyg, 68, 652–6.
- POULAIN-GODEFROY, O., GAUBERT, S., LAFITTE, S., CAPRON, A., GRZYCH, J.M. 1996. Immunoglobulin A response in murine schistosomiasis: stimulatory role of egg antigens. Infect Immun, 64, 763–8.
- RASO, P., BERNARDES, R.C., TAFURI, W.L., BOGLIOLO, L., NEVES, J. 1978. As Dimensões do Granuloma Causado Pelos Ovos do *Schistosoma mansoni* no Fígado Humano. Rev Soc Bras Med Trop, 12, 45– 49.
- REY, L. Bases da Parasitologia Médica. 3a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2010.
- RUMBLEY, C.A., ZEKAVAT, S.A., SUGAYA, H., PERRIN, P.J., RAMADAN, M. A., PHILLIPS, S.M. 1998. The *Schistosoma* granuloma: characterization of lymphocyte migration, activation, and cytokine production. J Immunol, 161, 4129–37.
- SANTANA, L. A., & GOMES, A. P. 2011. Esquistossomose mansônica : aspectos gerais, imunologia, patogênese e história natural. Rev. Bras. Clin. Med., 9, 0–7.
- SCHRAMM, G., HAAS, H. 2010. Th2 immune response against *Schistosoma mansoni* infection. Microbes Infect. Elsevier Masson SAS, 12, 881–8.
- SETO, E. Y. W., WONG, B. K., LU, D., & ZHONG, B. 2011. Human schistosomiasis resistance to praziquantel in China: should we be worried? The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, 85, 74–82.
- SHAPIRO, S. S., & WILK, M. B. 1965. An analysis of variance test for normality (complete samples). Biometrika, 52, 591–611.
- SHAW, M., ERASMUS, D. 1983. *Schistosoma mansoni*: dose-related tegumental surface changes after in vivo treatment with praziquantel. Z Parasitenkd, 69, 643–53.
- SIMÕES, C., NEVES, R. H., BARROS, L. D. A., BRITO, P. D., CRAVO, C. O., DE MOURA, E. G., & MACHADO-SILVA, J. R. 2002. Parasitological

- characteristics of *Schistosoma mansoni* infection in swiss mice with underlying malnutrition. Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz, 97 Suppl 1, 143–7.
- STADECKER, M. J. 1999. The Regulatory Role of the Antigen-Presenting Cell in the Development of Hepatic Immunopathology during Infection with *Schistosoma mansoni*. Pathobiology, 67, 269–272.
- STEINMANN, P., KEISER, J., BOS, R., TANNER, M., UTZINGER, J. 2006. Schistosomiasis and water resources development: systematic review, meta-analysis, and estimates of people at risk. Lancet Infect Dis, 6, 411–25.
- STURROCK, R., KARIUKI, H., THIONGO, F., GACHARE, J., OMONDI, B., OUMA, J., ... BUTTERWORTH, A. 1996. *Schistosomiasis mansoni* in Kenya: relationship between infection and anemia in schoolchildren at the community level. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg, 90, 48–54.
- THORS, C., JOKIRANTA, T.S., MERI, T., KAIREMO, K., MERI, S., LINDER, E. 2006. Immunoglobulin uptake and processing by *Schistosoma mansoni*. Parasite Immunol, 28, 421–8.
- TRISTÃO, A. R., MELO, A. L., VASCONCELOS, A. C., & GROSSI, F. M. 2000. Apoptose na modulação da resposta inflamatória aos ovos do *Schistosoma mansoni*. Arq. Bra. Med. Vet. Zootec., 52, 586–91.
- USAWAHANAKUL, W., KLTIKOON, V., TUENTA, C. 1993. Comparison of the Protective Efficacy on Mekongi Schistosomiasis in Mice Induced by Antigens Derived from Cercariae, Schistosomulae and Adult Worms. Asian Pacific Journal of Allergy and Immunology, 11, 71–77.
- VITORINO, R.R., de SOUZA, F.P.C., COSTA, A. P., JÚNIOR, F.C.F., SANTANA, L.A., GOMES, A.P. 2012. Esquistossomose mansônica: diagnóstico, tratamento, epidemiologia, profilaxia e controle. Rev Bras Clin Med, 10, 39–45.
- VOLLER, A. 1976. Enzyme immunoassays for parasitic diseases. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg, 76, 98–106.
- WALKER, A.J. 2011. The Biology of *Schistosome* Life Stages. Parasite & Vectors.
- WANG, W., WANG, L., LIANG, Y.-S. 2012. Susceptibility or resistance of praziquantel in human schistosomiasis: a review. Parasitol Res, 111, 1871–7.
- WEBSTER, J. P., GOWER, C. M., & NORTON, A. J. 2008. Evolutionary concepts in predicting and evaluating the impact of mass chemotherapy schistosomiasis

- control programmes on parasites and their hosts. *Evolutionary Applications*, 1, 66–83.
- WILLIAM, S., SABRA, A, RAMZY, F., MOUSA, M., DEMERDASH, Z., BENNETT, J. L., ... BOTROS, S. 2001. Stability and reproductive fitness of *Schistosoma mansoni* isolates with decreased sensitivity to praziquantel. *International Journal for Parasitology*, 31, 1093–100.
- WILSON, M.S., MENTINK-KANE, M.M., PESCE, J.T., RAMALINGAM, T.R., WYNN, T.A. 2007. Immunopathology of schistosomiasis. *Immunol Cell Biol*, 85, 148–54.
- WILSON, R.A., COULSON, P.S. 2009. Immune effector mechanisms against schistosomiasis: looking for a chink in the parasite's armour. *Trends Parasitol*, 25, 423–31.
- XIAO, S. 2005. Development of antischistosomal drugs in China, with particular consideration to praziquantel and the artemisinins. *Acta Trop*, 96, 153–67.
- YOSHIOKA, L. 2002. *Schistosoma mansoni* : estudo da patogenia da linhagem Santa Rosa (Campinas, SP, Brasil) em camundongos *Schistosoma mansoni* : a study of pathogenesis of Santa Rosa, 35, 203–207.
- ZANOTTI-MAGALHÃES, E. M., & MAGALHÃES, L. A. 1995. Relação entre a patogenicidade do *Schistosoma mansoni* em camundongos e a susceptibilidade do molusco vetor. III. Mortalidade, pesos corporal e das vísceras *.*Rev. Saúde Pública*, 29, 265-70.
- ZOUAIN, C.S., GUSTAVSON, S., OLIVEIRA, S.C., AZEVEDO, V., ALVES, J.B., GOES, A.M. 2000. The role of IL-10 and IgG1 in the protection and granulomatous response in *Schistosoma mansoni* P24-immunized mice. *Vaccine*, 19, 1218–24.

Sítios da internet consultados:

- (WHO 2012)- <http://www.who.int/features/qa/58/en/>
- (WHO 2014a)- <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs115/en/>
- (WHO 2014b)-
http://www.who.int/gho/neglected_diseases/schistosomiasis/en/
- Foto *Oncomelania* sp.- <http://en.wikipedia.org/wiki/Oncomelania>
- Foto *Tricula aperta*-
<http://www.bagniliggia.it/WMSD/HtmSpecies/5226000020.htm>
- Poster de uma campanha de consciencialização sobre schistosomose no Brasil.
<http://secsaude-smc.blogspot.pt/2012/04/campanhas-de-endemias-todo-vapor.html>

Anexos

Conversão do número de ovos a partir da técnica de Kato-Katz

O seguinte quadro permite o cálculo do número de ovos de *S. mansoni* por grama de fezes, multiplicando-se por 24 o número de ovos que se observam numa lâmina.

Nº de ovos encontrados na lâmina	Nº de ovos por grama	Nº de ovos encontrados na lâmina	Nº de ovos por grama	Nº de ovos encontrados na lâmina	Nº de ovos por grama
1	24	36	864	71	1704
2	48	37	888	72	1728
3	72	38	912	73	1752
4	96	39	936	74	1776
5	120	40	960	75	1800
6	144	41	984	76	1824
7	168	42	1008	77	1848
8	192	43	1032	78	1872
9	216	44	1056	79	1896
10	240	45	1080	80	1920
11	264	46	1104	81	1944
12	288	47	1128	82	1968
13	312	48	1152	83	1992
14	336	49	1176	84	2016
15	360	50	1200	85	2040
16	384	51	1224	86	2064
17	408	52	1248	87	2088
18	432	53	1272	88	2112
19	456	54	1296	89	2136
20	480	55	1320	90	2160
21	504	56	1344	91	2184
22	528	57	1368	92	2208
23	552	58	1392	93	2232
24	576	59	1416	94	2256
25	600	60	1440	95	2280
26	624	61	1464	96	2304
27	648	62	1488	97	2328
28	672	63	1512	98	2352
29	696	64	1536	99	2376
30	720	65	1560	100	2400
31	744	66	1584	101	2424
32	768	67	1608	102	2448
33	792	68	1632	103	2472
34	816	69	1656	104	2496
35	840	70	1680	105	2520